UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

OTÁVIO MENDES GIL

ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA AO
ESTUDO DA RESPOSTA BIOQUÍMICA DE
TECIDOS A COMPOSTOS LAMELARES

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
A original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
13/07/2015

OTÁVIO MENDES GIL

**Espectroscopia Raman aplicada ao estudo da resposta
bioquímica de tecidos a compostos lamelares**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Mestre em Química*

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Dalva Lúcia Araújo de Faria

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gil, Otávio Mendes
G463e Espectroscopia Raman aplicada ao estudo da resposta bioquímica
de tecidos a compostos lamelares / Otávio Mendes Gil. - São
Paulo, 2015.
137p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Faria, Dalva Lúcia Araújo de

1. Espectroscopia Raman 2. Composto inorgânico lamelar 3.
Inflamação I. T. II. Faria, Dalva Lúcia Araújo de, orientador.

543.08584 CDD

*Dedico todo este trabalho a minha família
por possibilitar a concretização de um sonho.*

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço primeiramente aos meus pais Hector Alexandre Chaves Gil e Égle Ferraz Mendes por forneceram todo tipo de apoio que necessitei durante a conclusão deste trabalho. Agradeço também aos meus irmãos Giovanni, Carlos Alexandre e Maria Luiza e a todos os demais familiares que sempre me creditaram confiança.

À amiga e companheira Bruna Rafaela Julio pelo suporte e incentivo em fases muito críticas de minha vida.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria pelos valioso conhecimentos passados e por contribuir de maneira ativa durante todo meu desenvolvimento acadêmico e pessoal, sempre me encorajando a enfrentar todas as adversidades de cabeça erguida.

Agradeço também à Prof.^a Dra. Vera R. L. Constantino e sua aluna Michele A. Rocha por todo o auxílio fornecido durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ivan H. J. Koh e seu aluno Rodrigo Barbosa por possibilitar a realização dos experimentos *in vivo*.

A todos os professores, alunos e ex-alunos de pós-graduação e iniciação científica do Laboratório de Espectroscopia Molecular

Ao IQUSP, à USP, ao CNPq pela bolsa concedida e a FAPESP e CAPES pelos auxílios financeiros.

“Never give up on something that you can’t go a day without thinking about”
Winston Churchill

*“... And then one day you find
Ten year you’ve got behind you
And no one told when to run
You missed the starting gun ...”*
Time - Pink Floyd

RESUMO

Gil. O. M. **Espectroscopia Raman aplicada ao estudo da resposta bioquímica de tecidos a compostos lamelares. 2015.** 137p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nesta Dissertação de Mestrado foram estudadas as respostas inflamatórias e de reparo de tecido muscular de ratos a implantes de hidróxidos duplos lamelares (HDL) contendo íon cloreto e sulindaco (fármaco anti-inflamatório não-esteroidal - FAINE) em seu espaço interlamelar.

As técnicas empregadas nesta investigação foram as espectroscopias Raman e de absorção no infravermelho (FTIR), a difratometria de raios X (XRD) e a análise histomorfológica dos tecidos corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) (Michalany, 1990)(Michalany, 1990)(Michalany, 1990)e *Picrosirius Red* (Picro). Simulações do espectro vibracional foram feitas por DFT usando o pacote computacional Gaussian 09 e as análises estatísticas foram feitas usando o pacote Unscrambler X.10.1.

Os experimentos *in vivo* foram realizados fazendo-se a implantação das pastilhas de HDL por microcirurgia entre as camadas do músculo externo oblíquo de ratos (Wistar) e como experimento controle foi feita a separação de tais camadas simulando um implante. Os tecidos foram coletados após 7, 21, 28 e 35 dias de pós operatório, divididos em duas porções (uma para análise histomorfológica e outra para análise por espectroscopia Raman).

Inicialmente foram feitos os cálculos teóricos e a caracterização espectroscópica do sulindaco, que possibilitou melhorar sua atribuição vibracional encontrada na literatura. O mesmo ocorreu com as matrizes de HDL, de Zn(II) e de Mg(II), intercaladas com íons cloreto, o que também resultou em um aprimoramento da atribuição que é encontrada na literatura.

Os dois HDLs intercalados com sulindaco também foram caracterizados espectroscopicamente e os espectros Raman mostraram grande semelhança com a espécie do fármaco desprotonado. O difratograma obtido dos intercalatos mostra expansão do espaçamento basal (de 7 Å para 26 Å) compatível com a intercalação do sulindaco inclinado em relação ao plano das lamelas.

Os espectros Raman do tecido controle mostram alterações mais significativas nas banda amida I e amida III com o tempo de pós-operatório e por PCA foi possível observar a nítida separação do grupo que apresenta um processo inflamatório agudo (7 dias).

Os tecidos expostos à pastilha de HDL intercalada com íons cloreto, mostraram resposta inflamatória reduzida em relação ao tecido controle e as alterações espectrais observadas evidenciam a presença de colágenos, o que indica uma aceitação da pastilha por parte do organismo (biocompatibilidade). As pastilhas também foram analisadas espectroscopicamente e mostraram que houve incorporação de íons CO_3^{2-} no espaço interlamelar, indicado pela presença da banda Raman em 1060 cm^{-1} (estiramento simétrico C-O nesse íon), mas não foi possível determinar se eventuais variações no pH local exerceram efeitos na resposta inflamatória.

No caso dos tecidos expostos à pastilha de HDL com sulindaco, a análise por microscopia Raman mostrou que o processo inflamatório foi significativamente reduzido, evidenciando uma ação local do fármaco, além do crescimento de colágenos do tipo III. A pastilha de HDL com sulindaco implantado foi analisada por FT-Raman e a liberação do fármaco foi confirmada.

Os resultados de espectroscopia Raman de tecidos foram confirmados pela análise histomorfológica, que mostrou haver de fato um acúmulo de colágeno do tipo III nas regiões próximas às pastilhas implantadas, assim como a formação de invaginações e neovascularização.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Hidróxidos Duplos Lamelares, processo inflamatório, reparo tecidual, liberação modificada de fármacos.

ABSTRACT

Gil, O. M. **Raman spectroscopy applied to the study of biochemical responses of tissues to lamellar compounds**. 2015. 137p . Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this Master's Thesis the inflammatory responses and tissue repair of rat muscles caused by implants of Lamellar Double Hydroxides (LDH) containing chloride ion and sulindac (anti-inflammatory non-steroidal drug - NSAID) in its interlayer space was studied.

The techniques used in this research were the Raman spectroscopy and infrared absorption spectroscopy (FTIR), the X-ray diffraction (XRD) and the histomorphological analysis of tissues stained by techniques of Hematoxylin and Eosin (HE) and *Picrosirius Red* (Picro). Simulations of vibrational spectrum were made by DFT using the computational package Gaussian 09 and the statistical analyzes were performed using the Unscrambler X.10.1 package.

In vivo experiments were performed by making the implantation of HDL tablets by microsurgery between the layers of the external oblique muscle of rats (Wistar) and as a control experiment the separation of the layers to simulate an implant was conducted. The tissues were collected after 7, 21, 28 and 35 days postoperatively, divided into two parts (one for histomorphological analysis and the other for analysis by Raman spectroscopy).

Initially, theoretical calculations and spectroscopic characterization of sulindac were made, which enabled improving its vibrational assignment in the literature. The same happened for the LDH matrices, Zn(II) and Mg(II), both with chloride ions in the interlamellar space, which also resulted in an improving of its vibrational assignment found in the literature.

Both LDH intercalated with sulindac were also characterized spectroscopically and their Raman spectra showed great agreement to the deprotonated species of the drug. The diffraction pattern obtained from intercalated compounds shows an expansion of the basal spacing (7 Å to 26 Å) compatible with the hypothesis of the sulindac inclined relative to the lamellar plane.

The Raman spectra control tissues show the most significant changes in the band amide I and amide III after different surgery times and through PCA was possible to observe the clear separation of the group that presenting an acute inflammatory process (at 7 days).

Tissues exposed to LDH pellet intercalated with chloride ions showed a reduced inflammatory response relative to control tissue and the spectral changes demonstrate the

presence of collagen, which indicates an acceptance of the insert by the body (biocompatibility). The pellets were also analyzed spectroscopically and showed that there was incorporation of CO_3^{2-} ions in the interlayer space, indicated by the presence of the Raman band at 1060 cm^{-1} (symmetric stretch C-O of this ion), but it was not possible to determine if changes in local pH affect the inflammatory response.

In the case of tissues exposed to LDH tablet with sulindac, analysis by Raman microscopy showed that inflammation was significantly reduced, indicating a local action of the drug, in addition, the collagen type III growth has been observed. The implanted LDH pellet with sulindac was analyzed by FT-Raman and the drug release was confirmed.

The results of Raman spectroscopy of tissues were confirmed by histomorphological analysis, which showed that there is indeed an accumulation of collagen type III in the tissue regions near to the implanted pellets, as well as the formation of invagination and neovascularization.

Keywords: Raman spectroscopy, Layered Double Hydroxides, inflammatory process, tissue repair, modified release of drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos efeitos de espalhamento elástico Rayleigh e inelásticos Anti-Stokes e Stoke nas curvas de potencial (V) em função da coordenada normal (Q_i).	24
Figura 2: Histograma com a produção científica envolvendo a espectroscopia Raman e tecidos desde 1990 até 2014. Os dados foram obtidos utilizando-se a base de dados Web of Science TM , que foi consultada em 24/11/2014. As palavras-chaves utilizadas foram “Raman and Tissues”.	26
Figura 3: Esquema mostrando a excitação e coleta por espectroscopia Raman convencional e suas variantes SORS e TRS. R representa a radiação espalhada inelasticamente, L o laser incidente e ΔS o deslocamento espacial. Esquema adaptado de Buckley e Matousek (2011).	27
Figura 4: Representação esquemática da composição muscular, mostrando o músculo, suas miofibras, miofibrilas e sarcômeros. Adaptado de Huard, <i>et al.</i> (2002)	29
Figura 5: Representação esquemática da estrutura do sarcômero quando contraído. Adaptado de Huard, <i>et al.</i> (2002).	30
Figura 6: Desenho esquemático evidenciando os componentes fundamentais do tecido conjuntivo: fibras, células residentes e transientes. Figura adaptada de Henrikson, <i>et al.</i> (1997).	31
Figura 7: Esquema dos eventos envolvidos no processo inflamatório e de reparo tecidual em escala temporal.	33
Figura 8: Estrutura esquemática da hidrotalcita, um LDH onde a razão entre os íons da lamela for 3:1. A^{m-} corresponde ao íon carbonato e M^{2+}/M^{3+} são íons Mg^{2+} e Al^{3+} . Figura extraída de Cunha, <i>et al.</i> (2010).	34
Figura 9: (a) Estrutura molecular do sulindaco em sua forma isomérica Z. e (b) a estrutura molecular da forma reduzida, em vermelho esta evidenciada a região que sofre redução.	36

Figura 10: Espectro FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) do Sul; em destaque é mostrada a região de estiramentos C-H.	48
Figura 11: Espectro FTIR-ATR do sulindaco.	48
Figura 12: Espectros vibracionais teóricos da molécula de sulindaco calculados por DFT. Acima encontra-se a simulação do espectro no infravermelho e abaixo a simulação do espectro Raman.	50
Figura 13: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) e FTIR-ATR do sal de sulindaco (Na-Sul); * indica a banda Raman mais afetada (1183 cm^{-1}); # indica as bandas IR que apareceram (1554 e 1376 cm^{-1}).	52
Figura 14: Difratoograma de raios X do sulindaco. As intensidades foram normalizadas para o pico mais intenso com 2θ igual a $21,4$ graus.	53
Figura 15: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) e FTIR-ATR do HDL de Zn_2AlCl	56
Figura 16: Espectro FTIR-ATR do HDL de zinco e alumínio junto com sua deconvolução espectral da região de 1100 a 400 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em vermelho, azul e verde, respectivamente.	58
Figura 17: Espectro FTIR-ATR do HDL de Zn_2AlCl junto com sua deconvolução espectral da região de 1900 a 1100 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em vermelho, azul e verde, respectivamente.	59
Figura 18: Esquemas de simetrias, D_{3h} , C_{2v} e C_s , em que o íon carbonato pode ser encontrado. M representa um cátion metálico da matriz.	62
Figura 19: Difratoograma de raios X do HDL de Zn_2AlCl	63
Figura 20: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) e FTIR-ATR do HDL de Mg_2AlCl	64

Figura 21: Espectro FTIR-ATR do HDL de $Mg_2Al.Cl$ junto com sua deconvolução espectral da região de 1100 a 400 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em vermelho, azul e verde, respectivamente.	65
Figura 22: Espectro FTIR-ATR do HDL de $Mg_2Al.Cl$ junto com sua deconvolução espectral da região de 1900 a 1100 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em vermelho, azul e verde, respectivamente.	65
Figura 23: Difratoograma de raios X do HDL de $Mg_2Al.Cl$	67
Figura 24: Espectros FT-Raman de HDL de $Mg_2Al.Cl$ em vermelho e HDL de $Zn_2Al.Cl$ em azul, os traços pontilhados evidenciam o comportamento oposto das duas bandas.....	67
Figura 25: Espectros FT-Raman de HDL de zinco e alumínio com cloreto e com sulindaco intercalado no espaço interlamelar, $Zn_2Al.Cl$ e $Zn_2Al.Sul$ respectivamente, e de sulindaco (Sul).	69
Figura 26: Espectros FTIR de HDL de zinco e alumínio com cloreto e com sulindaco intercalado no espaço interlamelar, $Zn_2Al.Cl$ e $Zn_2Al.Sul$ respectivamente, e de sulindaco (Sul).....	71
Figura 27: Difratoogramas de raios X das matrizes de $Zn_2Al.Cl$, $Zn_2Al.Sul$ e de Sul comercial..	72
Figura 28: A) Esquema de intercalação com cloreto entre camadas da matriz de HDL. B) Esquema proposto para a intercalação das moléculas de sulindaco entre camadas da matriz de HDL.....	73
Figura 29: Espectros FT-Raman de HDL de magnésio e alumínio com cloreto e com sulindaco intercalado no espaço interlamelar, $Mg_2Al.Cl$ e $Mg_2Al.Sul$ respectivamente, e de sulindaco (Sul).	73
Figura 30: Espectros FTIR de HDL de zinco e alumínio com cloreto e com sulindaco intercalado no espaço interlamelar, $Zn_2Al.Cl$ e $Zn_2Al.Sul$ respectivamente, e de sulindaco (Sul).....	74
Figura 31: Difratoogramas de raios X das matrizes de $Mg_2Al.Cl$, $Mg_2Al.Sul$ e de Sul comercial.	75

Figura 32: Espectro padrão de tecido muscular, o traço escuro mostra o espectro médio e a região em cinza mostra a variância entre os espectros obtidos.	77
Figura 33: Espectros Raman (785 nm) de referência para actina e miosina, retirados de Zoladek, <i>et al.</i> (2010)	80
Figura 34: Espectros Raman médios obtidos dos tecidos controle em diferentes períodos de pós-operatório. O traço em preto é o espectro médio, a área em cinza representa a variância entre os espectros obtidos e as linhas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.	81
Figura 35: Gráficos obtidos por PCA dos <i>scores</i> de PC-1 em função de PC-2 para o grupo controle. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.	85
Figura 36: Gráficos obtidos por PCA dos <i>scores</i> de PC-1 em função de PC-3 para o grupo controle. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.	86
Figura 37: Gráficos obtidos por PCA dos <i>scores</i> de PC-2 em função de PC-3 para o grupo controle. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.	86
Figura 38: Gráficos de <i>loadings</i> das três primeiras componentes principais para os espectros dos tecidos musculares padrão em diferentes períodos de pós-operatório	88
Figura 39: A) Representação esquemática do animal, a linha pontilhada representa o local do corte. B) Localização dos implantes de HDL intramusculares no músculo oblíquo externo. As setas indicam o local dos pontos cirúrgicos. O número 1 é o local em que foi feita a incisão controle, o 2 é o local do implante da matriz $Zn_2Al.Cl$ e o 3 é o local da de implante da matriz $Zn_2Al.Sul$	90

Figura 40: Imagens de transiluminação com luz branca das regiões de implante, ambas após 28PO; em A), é mostrada a região com pastilha de Zn_2AlCl ; Em B) é mostrada a região com pastilha de Zn_2AlSul	91
Figura 41: Em A) é mostrada uma imagem de como a amostra chega para análise por espectroscopia Raman; Em B) é mostrada a mesma amostra após a separação dos folhetos musculares entre os quais a pastilha de Zn_2AlCl foi implantada.	91
Figura 42: Espectros Raman médios obtidos dos tecidos em contato com a matriz de Zn_2AlCl em diferentes períodos de pós-operatório. O traço em preto é o espectro médio, a área em cinza representa a variância entre os espectros obtidos e as linhas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.....	92
Figura 43: Espectros FT-Raman de colágeno tipo III, em vermelho, e colágeno tipo I, preto. ...	94
Figura 44: Gráficos obtidos por PCA dos <i>scores</i> de PC-1 em função de PC-2 para o grupo de tecidos em contato com o HDL de Zn_2AlCl . As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.	96
Figura 45: Gráficos obtidos por PCA dos <i>scores</i> de PC-1 em função de PC-3 para o grupo de tecidos em contato com o HDL de Zn_2AlCl . As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.	96
Figura 46: Gráficos de <i>loadings</i> das três primeiras componentes principais para os espectros dos tecidos musculares que ficaram em contato com pastilhas de Zn_2AlCl em diferentes períodos de pós-operatório.....	97
Figura 47: Espectros Raman médios obtidos dos tecidos em contato com a matriz de Zn_2AlSul em diferentes períodos de pós-operatório. O traço em preto é o espectro médio, a área em cinza representa a variância entre os espectros obtidos e as linhas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.....	100

Figura 48: Gráficos obtidos por PCA dos <i>scores</i> de PC-1 em função de PC-2 para o grupo de tecidos em contato com o HDL de Zn ₂ Al.Sul. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.	103
Figura 49: Gráficos obtidos por PCA dos <i>scores</i> de PC-1 em função de PC-3 para o grupo de tecidos em contato com o HDL de Zn ₂ Al.Sul. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.	104
Figura 50: Gráficos de <i>loadings</i> das três primeiras componentes principais para os espectros dos tecidos musculares que ficaram em contato com pastilhas de Zn ₂ Al.Sul em diferentes períodos de pós-operatório.....	105
Figura 51: Fotomicrografias dos tecidos controle nos períodos de 7PO, 21PO, 28PO e 35PO, com aumento de 20x. Coloração por HE.....	108
Figura 52: Fotomicrografias dos tecidos controle nos períodos de 21PO, 28PO e 35PO. A região em vermelho indica a presença de colágeno do tipo I (seta branca contínua) e a região em verde indica ser do tipo III (seta branca descontínua). Aumento 20x com técnica Picro de coloração.	109
Figura 53: Fotomicrografia dos tecidos implantados com matriz de Zn ₂ Al.Cl nos períodos de 7PO, 21PO, 28PO e 35PO, com aumento de 20x. As barras pretas são para evidenciar a variação da espessura do tecido conjuntivo que envolve a pastilha implantada. Coloração por HE.....	111
Figura 54: Fotomicrografias dos tecidos implantados com Zn ₂ Al.Cl nos períodos de 21PO, 28PO e 35PO. A região em vermelho indica a presença de colágeno do tipo I (seta branca contínua) e a região em verde indica ser do tipo III (seta branca descontínua). Aumento 20x com técnica Picro de coloração.....	112
Figura 55: Fotomicrografia dos tecidos implantados com matriz de Zn ₂ Al.Sul nos períodos de 7PO, 21PO, 28PO e 35PO, com aumento de 20x. As barras pretas são para evidenciar a variação da espessura do tecido conjuntivo que envolve a pastilha implantada, e a seta branca evidencia a	

formação de neovascularização e a seta preta evidencia a localização de uma invaginação de tecido dentro da pastilha. Coloração por HE. 113

Figura 56: Fotomicrografias dos tecidos implantados com $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ nos períodos de 21PO, 28PO e 35PO. A região em vermelho indica a presença de colágeno do tipo I (seta branca continua) e a região em verde indica ser do tipo III (seta branca descontinua). A seta preta evidencia uma invaginação de tecido na pastilha. Aumento 20x com técnica Picro de coloração. 115

Figura 57: Espectros FT-Raman da região de 3500 a 2650 cm^{-1} da pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ padrão e as removidas aos 7PO, 21PO, 28PO e 35PO após os implantes. 117

Figura 58: Espectros FT-Raman da região de 1300 a 400 cm^{-1} da pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ padrão e as removidas aos 7PO, 21PO, 28PO e 35PO após os implantes. 118

Figura 59: Espectros FT-Raman da região de 1660 a 1540 cm^{-1} da pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ padrão e as removidas aos 7PO, 21PO, 28PO e 35PO após os implantes. 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atribuições tentativas para os espectros Raman e no infravermelho baseados nas frequências vibracionais calculadas e corrigidas (fator de correção = 0,9679).....	51
Tabela 2: Valores de 2θ e intensidades normalizadas para os polimorfos do sulindaco do tipo I (SUL I) e II (SUL II) e do sulindaco comercial (SUL exp).	54
Tabela 3: Atribuições das bandas Raman encontradas nos espectros dos HDLs de zinco e de magnésio.....	57
Tabela 4: Atribuições tentativas das bandas no infravermelho encontradas nos espectros dos HDLs de zinco e de magnésio.	60
Tabela 5: Tabela de correlação entre as simetrias D_{3h} , D_3 , C_{2v} e C_s	61
Tabela 6: Atribuições tentativas de bandas encontradas nos espectros Raman de tecidos musculares sadios.	78
Tabela 7: Posições das bandas amida I e III para os diferentes períodos de pós-operatório dos tecidos controle.....	83
Tabela 8: Valores das posições encontradas na literatura para as bandas amida I e III e suas respectivas atribuições.....	83
Tabela 9: Posições das bandas Amida I e III para os diferentes períodos de pós-operatório dos tecidos em contato com matriz de $Zn_2Al.Cl$	93
Tabela 10: Posições das bandas Amida I e III para os diferentes períodos de pós-operatório dos tecidos em contato com matriz de $Zn_2Al.Sul$	102
Tabela 11: Valores de intensidade das bandas em 552 e 1060 cm^{-1} e os valores obtidos pela razão entre as suas intensidades nos diferentes períodos de pós-operatório.....	119

Tabela 12: Valores de intensidade da banda do sulindaco, localizada em 1621 cm^{-1} , das pastilhas implantadas e suas respectivas porcentagens em relação à intensidade da mesma banda da pastilha padrão.....	122
---	-----

SUMÁRIO

1. Introdução	22
1.1. Apresentação do trabalho	22
1.2. Espectroscopia Raman	23
1.3. Tecidos biológicos e seu processo inflamatório.....	28
1.4. Hidróxidos Duplos Lamemares (HDL) e suas aplicações	33
1.5. Fármacos Anti-Inflamatórios Não-Esteroidias (FAINES): Sulindaco	36
2. Objetivos.....	38
3. Parte experimental	39
3.1. Proteínas.....	39
3.2. Sulindaco.....	39
3.3. Síntese e caracterização dos hidróxidos duplos lamelares (HDLs) com e sem sulindaco ...	39
3.4. Procedimentos cirúrgicos <i>in-vivo</i>	41
3.4.1.Implantes dos hidróxidos duplos lamelares em animais	42
3.4.2.Reoperação para obtenção das amostras das matrizes implantadas e do controle.....	42
3.4.3.Caracterização Raman dos tecidos <i>ex vivo</i>	43
3.5. Análise histológica	44
3.6. Instrumentação	44
3.6.1.Espectroscopia de absorção no infravermelho	44
3.6.2.Espectroscopia Raman	45
3.6.3.Difratometria de raios X.....	45
3.7. Simulações vibracionais e métodos estatísticos	46
3.7.1.Simulações vibracionais.....	46

3.7.2. Análise espectral	46
3.7.3. Método estatístico	46
4. Resultados e Discussão	47
4.1 Sulindaco.....	47
4.1.1. Caracterização por espectroscopia vibracional e difratometria de raios X	47
4.2. Hidróxidos duplos lamelares (HDL).....	55
4.2.1. Caracterização por espectroscopia vibracional e difratometria de raios X das matrizes de HDL ($Zn_2Al.Cl$ e $Mg_2Al.Cl$).....	56
4.2.2. Caracterização por espectroscopia vibracional e difratometria de raios X das matrizes de HDL com fármaco intercalado ($Zn_2Al.Sul$ e $Mg_2Al.Sul$).....	68
4.3. Análise do processo cicatricial em tecidos musculares por espectroscopia Raman	76
4.3.1. Análise dos tecidos do grupo controle	77
4.4. Análise dos tecidos submetidos a implantes de HDL	89
4.4.1. Análise dos tecidos submetidos a implantes de HDL de $Zn_2Al.Cl$	92
4.4.2. Análise dos tecidos submetidos a implantes de HDL de $Zn_2Al.Sul$	99
4.5. Análise histomorfológica dos tecidos	107
4.6. Análise das pastilhas implantadas de HDL por espectroscopia Raman.....	116
4.6.1. Análise das pastilhas implantadas de $Zn_2Al.Cl$ por espectroscopia Raman	117
4.6.2. Análise das pastilhas implantadas de $Zn_2Al.Sul$ por espectroscopia Raman.....	120
5. Conclusões	123
6. Perspectivas futuras	126
7. Referências.....	128

1. Introdução

1.1. Apresentação do trabalho

A Dissertação aqui apresentada é o resultado da colaboração entre o Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) especificamente do grupo de espectroscopia Raman aplicada coordenado pela Prof.^a Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria do IQUSP, o Laboratório de Sólidos Lamelares (LabSol) coordenado pela Prof.^a Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino também do IQUSP e o Laboratório de Pesquisa Experimental coordenado pelo Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh do Departamento de Cirurgia da EPM-UNIFESP.

O grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ivan H. J. Koh já realiza colaborações de longa data com o grupo de pesquisa da Prof.^a Dra. Vera R. L. Constantino no estudo de biointegração e biocompatibilidade de sólidos inorgânicos lamelares como implantes carregadores de fármacos.

Por outro lado, a Prof.^a Dra. Dalva Faria vinha colaborando em estudos de reparo de tecidos anastomosados com outro grupo de pesquisa da EPM-UNIFESP (Dr. Marco A. Bastos e Prof. Dr. Hélio Plaper) e o sucesso no uso da espectroscopia Raman neste estudo aproximou os pesquisadores e originou o estudo aqui reportado.

Em um mundo onde avanços tecnológicos são diariamente divulgados, faz-se necessário que as diferentes áreas da ciência interajam entre si para que seja possível acompanhar tal dinamismo. Especialmente na área das ciências biológicas onde os métodos diagnósticos ainda considerados “gold standards”, com por exemplo, as análises histomorfológicas e histomorfoquímicas, que, apesar de fornecerem respostas indubitáveis a respeito das possíveis patologias, levam de horas até dias para serem concluídos e seus resultados analisados, além de

serem muito invasivas já que biópsias são necessárias, gerando assim um desconforto ao paciente que por vezes necessita de um período de recuperação após esses procedimentos. Desta forma, visando acelerar os processos dos mais diversos tipos de diagnósticos e terapias, vem se utilizando cada vez mais técnicas ópticas em que a interação entre a luz e matéria, no caso tecidos biológicos, pode fornecer as informações necessárias para diagnósticos precoces de maneira muito rápida e de uma forma não invasiva ao paciente.

Nesta conjunção de diferentes áreas de pesquisa é inserido este trabalho que tem o intuito de usar a espectroscopia Raman na avaliação de respostas bioquímicas de tecidos, especificamente tecidos musculares, a compostos inorgânicos lamelares implantados.

1.2. Espectroscopia Raman

Dentre as técnicas óticas que vem sendo utilizadas no contexto da biomedicina, encontra-se a espectroscopia Raman que é um método não invasivo e não destrutivo de se obter informações detalhadas sobre a estrutura e composição molecular de diferentes amostras, dentre elas os tecidos de origem biológica, e fornece o que pode se chamar de “impressão digital” das substâncias nas bandas Raman, determinadas pelos suas posições em números de onda bem conhecidos e atribuídos às vibrações das ligações químicas encontradas nas moléculas prova (Downes e Elfick, 2010; Manoharan, *et al.*, 1996; Tu, 1982).

A técnica baseia-se no fenômeno físico de espalhamento inelástico de radiação eletromagnética e para que haja atividade Raman a molécula deve apresentar variação na sua polarizabilidade, $\vec{\alpha}$, em relação à coordenada normal de vibração, Q_i , em torno da posição do equilíbrio, $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0$. Quando uma radiação monocromática de energia $E = h\nu_0$, geralmente

com ν_0 na região do espectro eletromagnético que abrange desde o UV (100 a 400 nm), passando pelo visível (400 a 780 nm) até a região do infravermelho próximo (780 a 2500 nm), incide sobre o sistema molecular, perturba-o e o leva a um estado virtual de maior energia, a partir do qual são espalhados fótons, como mostrado na Figura 1.

Figura 1: Representação dos efeitos de espalhamento elástico Rayleigh e inelásticos Anti-Stokes e Stokes nas curvas de potencial (V) em função da coordenada normal (Q_i).

Entre os espalhamentos possíveis está o espalhamento elástico, ou espalhamento Rayleigh, em que o fóton espalhado tem a mesma energia do fóton incidente e assim a diferença de energia observada é nula ($\Delta E = h\nu_0 - h\nu' = 0$). Também são possíveis os espalhamentos inelásticos Stokes e Anti-Stokes.

Nomeia-se como espalhamento Stokes quando uma molécula em um determinado nível vibracional é excitada a um estado virtual e em seguida decai para um nível vibracional de maior energia, portanto, espalhando um fóton com energia menor do que o fóton incidente de energia igual a $E = h\nu' = h\nu_0 - e_v$, sendo e_v a diferença de energia vibracional entre níveis vibracionais consecutivos. Neste caso a diferença de energia observada é positiva ($\Delta E = h\nu_0 - h\nu' > 0$).

O espalhamento Anti-Stokes é definido quando a molécula já excitada decai do estado virtual para um estado vibracional de menor energia do que o estado de partida, espalhando um

fóton com energia maior do que a energia do fóton inicial, $h\nu' = h\nu_0 + e_v$, portanto, a diferença de energia observada é negativa ($\Delta E = h\nu_0 - h\nu' < 0$) (Hollas, 2008; Sala, 2008).

As diferenças de energia observadas, são, portanto, características de cada tipo de ligação químicas e o conjunto delas em função de suas intensidades, formam o espectro Raman.

As amostras de origem biológicas por apresentarem uma alta complexidade molecular, normalmente macromoléculas proteicas, e alta sensibilidade a fatores extrínsecos que podem gerar a denaturação de suas estruturas, como radiação, temperatura e pH, não foram amplamente estudadas nos primórdios da utilização da espectroscopia Raman, décadas de 1930 à 1950, além também, dos fatores intrínsecos da técnica, pois o espalhamento Raman é um efeito muito fraco onde aproximadamente 1 em cada 10^8 fótons é espalhado inelasticamente, juntamente com os fatores instrumentais como a baixa capacidade de detecção de tais fótons espalhados pelos detectores da época (chapas fotográficas), o que gerava a necessidade da utilização de fontes de excitação luminosas muito intensa, o que podia degradar as amostras estudadas.

Essencialmente a partir na década de 1960 com a comercialização de lasers, fontes de radiação monocromática de alta intensidade, e o avanço da tecnologia eletrônica, o que permitiu o advento de melhores sistemas de detecção, é que as amostras biológicas ganharam campo dentro das aplicações da espectroscopia Raman (Manoharan, *et al.*, 1996). Ainda assim, apenas em meados da década de 1970 é que um expressivo número de estudos foi feito mostrando a potencialidade da técnica em estudos *in vitro* de tecidos, por exemplo, tecidos oculares e musculares (Ozaki, *et al.*, 1987; Pézolet e Georgescauld, 1985; Pézolet, *et al.*, 1980), além do surgimento do conceito da aplicação na clínica médica, como por exemplo, na análise de sangue (Larsson e Hellgren, 1974) e na identificação de fármacos após sua metabolização (Morris, 1975; Morris, 1976; Ozaki e Iriyama, 1987; Rahaman e Morris, 1976; Sato, *et al.*, 1980).

Fazendo-se uma busca pelas palavras-chaves “Raman and Tissue” na base de dados Web of ScienceTM é possível notar um grande crescimento das publicações científicas envolvendo a espectroscopia Raman e tecidos biológicos a partir dos anos 1990 até 2014. O histograma com os dados obtidos pela busca é mostrado na Figura 2.

Figura 2: Histograma com a produção científica envolvendo a espectroscopia Raman e tecidos desde 1990 até 2014. Os dados foram obtidos utilizando-se a base de dados Web of ScienceTM, que foi consultada em 24/11/2014. As palavras-chaves utilizadas foram “Raman and Tissues”.

A partir de 1990 é que análises *in vivo* ganharam campo, muito por conta do desenvolvimento de fibras óticas apropriadas que possuíam pequeno diâmetro, grande flexibilidade e alta capacidade na coleta da radiação espalhada (Adar, 2001).

Desde então, diversos estudos foram realizados envolvendo a área biomédica e dentre eles vale destacar as recentes aplicações na identificação de diversos tipos de carcinomas (Bergholt, *et al.*, 2011; Carvalho, *et al.*, 2015; Synytsya, *et al.*, 2014; Talari, *et al.*, 2015; Valdés,

et al., 2014), a utilização na caracterização de diferentes tipos de tecido de origem humana (De Faria e de Souza, 1999; De Gelder, *et al.*, 2007; Movasaghi, *et al.*, 2007) e também trabalhos relacionados ao acompanhamento de processos de reparo tecidual (Alimova, *et al.*, 2009; Crane e Elster, 2012; da Silva, 2013; Gautam, *et al.*, 2015; Jain, *et al.*, 2014; Makowski, *et al.*, 2012).

Ainda é válido ressaltar a existência de outras técnicas baseadas no espalhamento Raman que mostram um grande potencial de aplicação na área das ciências biológicas. A primeira a ser brevemente discutida é a espectroscopia Raman espacialmente deslocada, ou do inglês, *Spatially Offset Raman Spectroscopy* (SORS), que é baseada no mesmo princípio do fenômeno Raman convencional, porém os fótons coletados são os fótons da área radial do entorno do foco do laser, o que fornece informações de camadas mais profundas do que apenas da superfície em que o laser foi focalizado. Isso permite, por exemplo, o estudo da composição de camadas subcutâneas de pele humana sem a necessidade de técnicas microscópicas confocais (Matousek, *et al.*, 2006; Rae, *et al.*, 2014). Há também a técnica de espectroscopia Raman de transmissão, ou do inglês *Transmission Raman Spectroscopy* (TRS), que permite a obtenção de espectros de amostras opacas e heterogêneas (Buckley e Matousek, 2011). A Figura 3 mostra um esquema de excitação e coleta das duas técnicas citadas acima.

Figura 3: Esquema mostrando a excitação e coleta por espectroscopia Raman convencional e suas variantes SORS e TRS. R representa a radiação espalhada inelasticamente, L o laser incidente e Δs o deslocamento espacial. Esquema adaptado de Buckley e Matousek (2011).

Finalmente, vale comentar a existência de um recurso avançado da espectroscopia Raman que vem sendo empregado com sucesso em aplicações biológicas e médicas e que usa o espalhamento Raman coerente na região anti-Stokes, do inglês *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering* (CARS). Essa técnica emprega dois feixes de laser pulsados e é mais eficiente que a espectroscopia Raman convencional do ponto de vista de secção de choque para espalhamento, porém, apresenta algumas limitações, entre elas o custo e a maior complexidade da instrumentação. Essa técnica tem sido utilizada principalmente em imageamento de tecidos de origem biológica como pele, tecido adiposo, tecido cerebral, culturas celulares, entre outros (Downes e Elfick, 2010; Evans e Xie, 2008; Krafft e Popp, 2015; McVey e Crain, 2014; Tu e Boppart, 2014; Zhang, *et al.*, 2014).

1.3. Tecidos biológicos e seu processo inflamatório

Um tecido pode ser definido como um grupo ou camada de células com estrutura semelhante que desempenham funções específicas. O corpo humano é constituído por 4 tipos de tecidos (tecidos primários): epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso.

Tecidos musculares, em especial o tecido muscular estriado esquelético que é o responsável por contrações voluntárias, são formados por conjuntos de fibras musculares compostos por células musculares (miofibras). Tais células são constituídas por miofibrilas que são agregados organizados longitudinalmente de sarcômeros, que por sua vez são responsáveis pelo movimento de contração muscular e possuem uma estrutura formada principalmente por duas proteínas filamentosas chave, a actina e miosina, Figura 4.

A palavra músculo tem sua origem na palavra latina para rato (*mūs*), uma vez que o movimento de contração muscular causado pela movimentação dos sarcômeros era associado com o

movimento de um rato sob o tapete (Chivas, 2011), pois de modo resumido, é o deslizamento da actina sobre a miosina auxiliado por diversos eventos bioquímicos concomitantes que causa a contração do sarcômero ou o seu alongamento. Esse efeito em uma reação em cadeia nas fibras de um músculo é que gera então a contração muscular (Junqueira e Carneiro, 2008). O esquema de contração do sarcômero é mostrado na Figura 5.

Figura 4: Representação esquemática da composição muscular, mostrando o músculo, suas miofibras, miofibrilas e sarcômeros. Adaptado de Huard, *et al.* (2002)

Figura 5: Representação esquemática da estrutura do sarcômero quando contraído. Adaptado de Huard, *et al.* (2002).

O tecido que envolve e une os músculos é o tecido conjuntivo, que diferentemente do tecido muscular não apresenta necessariamente uma alta organização e tem em sua composição diversos tipos de células e a matriz extracelular, MEC, matriz esta que promove a coesão da maioria dos tecidos em um organismo animal.

As células principais da composição do tecidos conjuntivo são as células adiposas, fibras colágenas, fibras elásticas, mastócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos, células plasmáticas, células hematopoéticas e células sanguíneas (Henrikson, *et al.*, 1997; Junqueira e Carneiro, 2008). Tais células são dependentes do local e situação fisiológica em que o tecido se encontra, por exemplo, um tecido sob infecção de um organismo externo tende a apresentar mais células de defesa como os polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), e tecido conjuntivos em locais de armazenamento de energia apresentam alta quantidade de células adiposas. Um desenho esquemático das células fundamentais do tecido conjuntivo é mostrado na Figura 6.

Figura 6: Desenho esquemático evidenciando os componentes fundamentais do tecido conjuntivo: fibras, células residentes e transitórias. Figura adaptada de Henrikson, *et al.* (1997).

Segundo Moslen e Smith (1992), a definição de trauma tecidual é a alteração que remove a viabilidade ou função essencial do tecido, portanto, nem toda resposta biológica a perturbações impostas ao tecido é perniciosa. Disso pode-se concluir que nem toda perturbação seja um trauma. Ainda assim processos cirúrgicos normalmente são considerados traumáticos ao organismo, fato este que tende a ser minimizado através de procedimentos microcirúrgicos.

No contexto deste trabalho, ainda que não sejam causados traumas de grande extensão, visto que todos os procedimentos são microcirúrgicos, danos celulares são causados inevitavelmente e desencadeiam um processo inflamatório para o reparo do tecido afetado. O processo inflamatório

pode ser desencadeado de diversas formas, entre elas estão a ação bacteriana/infecção, disfunção tecidual e, como é o caso, trauma/dano ao tecido.

A partir da lesão, o processo inflamatório para reparo tecidual é iniciado e consiste de várias etapas que são inter-relacionadas e que se sobrepõem temporalmente.

As etapas do processo de reparo tecidual começam com a necrose ou degeneração das células afetadas, a imediata coagulação pelo deslocamento de plaquetas para evitar perda sanguínea e a homeostase causando a vaso constrição a fim de atingir o equilíbrio circulatório na região afetada; A segunda etapa é o processo inflamatório no qual de 1 a 3 dias após o trauma há um acúmulo de neutrófilos no local afetado a fim de remover possíveis bactérias na área por meio de fagocitose. Ainda no processo inflamatório de 3 a 4 dias após o trauma há uma diminuição da quantidade de neutrófilos e um aumento da concentração de macrófagos, que por sua vez farão a limpeza de células inviáveis também por fagocitose, além de terem um papel muito importante nos estágios finais da inflamação por armazenar e liberar fatores de crescimento para promover a síntese de tecidos conjuntivos e a neovascularização; Após 4-7 dias o processo inflamatório está em seus estágios finais e começa então o processo de proliferação celular, que dura aproximadamente até o 21º dia após o trauma e é caracterizado pela migração de fibroblastos, formação e deposição de uma nova MEC, assim como a formação de neovascularização e a síntese e deposição de colágenos; Até o 28º dia pós-trauma as lesões já devem ter se fechado, terminando assim o primeiro ciclo do reparo tecidual. Após esse período o remodelamento da MEC tem seu início, reorganizando a matriz tecidual depositada e, em caso de fibrose, a formação do tecido cicatricial que por sua vez não permite que a completa reparação do tecido ocorra, gerando então problemas fisiológicos dependendo do tipo de tecido em que a lesão foi causada (Beldon, 2010; Clark, 1989; Gailit, 1994; Huard, *et al.*, 2002; Maxson, *et al.*, 2012; Medzhitov, 2008)

A Figura 7, esquematiza os eventos de reparo tecidual em uma escala temporal.

Figura 7: Esquema dos eventos envolvidos no processo inflamatório e de reparo tecidual em escala temporal.

1.4. Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) e suas aplicações

Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs), são compostos inorgânicos que possuem sua estrutura derivada do mineral brucita, de fórmula mínima $Mg(OH)_2$, sendo o mais comum a hidrotalcita, motivo pelo qual os HDLs também são conhecidos como compostos do tipo hidrotalcita.

Esses compostos apresentam estruturas organizadas bidimensionalmente, ou seja, são lamelares e podem ser descritos a partir de camadas da brucita em que os cátions de magnésio são coordenados octaedralmente por ânions hidroxila. Esta cela octaédrica é então ligada a outras celas pelas suas bordas, formando a lamela. Quando os cátions bivalentes, no caso Mg^{2+} , são substituídos isomorficamente por cátions trivalentes, que para formar a estrutura da hidrotalcita devem ser Al^{3+} , cria-se uma carga residual positiva que é compensada com a presença de ânions

no espaço interlamelar, para que a estrutura fique eletricamente neutra. No caso da hidrotalcita o ânion interlamelar é o íon carbonato, gerando então um mineral de fórmula mínima igual a $[\text{Mg}_{0,75}\text{Al}_{0,25}(\text{OH})_2](\text{CO}_3)_{0,5}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$. Além de ânions, espécies neutras também são aceitas no espaço interlamelar (Cavani, *et al.*, 1991; Cunha, *et al.*, 2010; Evans e Slade, 2005; Forano, *et al.*, 2006). A estrutura esquemática da hidrotalcita é mostrada na Figura 8.

A substituição isomórfica de cátions bivalentes, M^{2+} , por trivalentes, M^{3+} , pode apresentar diversos valores de razão entre tais cátions, $\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$, alterando assim a densidade de carga, o que influi diretamente na capacidade de troca iônica do material e fornecendo uma grande variedade de compostos isoestruturais (Goh, *et al.*, 2008). Geralmente valores de $\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$ elevados não são recomendados quando se deseja utilizar a propriedade de troca iônica de tais HDLs (Li e Duan, 2006).

Figura 8: Estrutura esquemática da hidrotalcita, um LDH onde a razão entre os íons da lamela for 3:1. $\text{A}^{\text{m-}}$ corresponde ao íon carbonato e $\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$ são íons Mg^{2+} e Al^{3+} . Figura extraída de Cunha, *et al.* (2010).

A estrutura citada acima é referente à hidrotalcita, porém existem também HDLs em que os cátions bivalentes podem ser Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , entre outros, e os cátions trivalentes Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Ga^{3+} e etc. Desta forma chega-se a uma fórmula geral para esses compostos igual a $[\text{M}^{2+}_{(1-x)}\text{M}^{3+}_x(\text{OH})_2](\text{A}^{n-})_{x/n} \cdot z\text{H}_2\text{O}$, onde A representaria o ânion interlamelar e n a sua carga.

A composição iônica interlamelar pode ser muito variada, incluindo haleto, oxoânions não metálicos, complexos aniônicos de metais de transição, ânions orgânicos voláteis, polímeros aniônicos, aminoácidos, fármacos, entre outros (Chakraborti, *et al.*, 2012; Charradi, *et al.*, 2010; Goh, *et al.*, 2008; Gordijo, *et al.*, 2005; Khan, *et al.*, 2001; Li e Duan, 2006; Minagawa, *et al.*, 2012; Prasad, *et al.*, 2010; Rodrigues, *et al.*, 2013; Viseras, *et al.*, 2010).

No contexto dos diferentes intercalatos é que se encontram, por exemplo, estudos da aplicação do potencial farmacológico dos HDLs através da liberação controlada de fármacos. Tal aplicação permite a otimização de ações terapêuticas através da manutenção da concentração do fármaco em um local específico, além da possibilidade de minimizar efeitos danosos sobre órgãos indesejados.

Fármacos que possuam a capacidade de formação de sais por desprotonação podem ser intercalados nos HDL, sendo alguns deles já explorados nesse sentido por apresentarem tal característica além de possuir ação anti-inflamatória e analgésica como, por exemplo, os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (FAINES) ibuprofeno, fenbufeno, cetoprofeno, diclofenaco, naproxeno, ácido acetilsalicílico, indometacina e sulindaco (Bonina, *et al.*, 2008; Cunha, *et al.*, 2010; Delarco, *et al.*, 2009; Kong, *et al.*, 2010; Parello, *et al.*, 2010; Rives, *et al.*, 2013; Rodrigues, *et al.*, 2013; Wang, *et al.*, 2014).

1.5. Fármacos Anti-Inflamatórios Não-Esteroidias (FAINEs): Sulindaco

A classe dos fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais é uma das maiores categorias de medicamento existentes e abrange alguns dos mais prescritos mundialmente, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico, movendo assim grande parte do capital que envolve indústrias farmacêuticas. Por essa razão ainda é foco de muitos estudos no que se refere ao aumento do aproveitamento de tais fármacos pelo organismo e formas de redução de possíveis efeitos colaterais, principalmente relacionados ao trato gastrointestinal (Lemke e Williams, 2013).

Inserido nesta classe de FAINEs está o sulindaco, fármaco sintetizado como um substituto à indometacina, uma vez que diminuiria os efeitos colaterais e possuiria ação anti-inflamatória mais potente. O sulindaco apresenta estereoisomeria e, portanto, existe em duas formas, Z e E, sendo a forma Z a que possui maior atividade biológica. As estruturas moleculares da forma Z do sulindaco e da sua forma reduzida, sulfeto, são mostrada na Figura 9.

Figura 9: (a) Estrutura molecular do sulindaco em sua forma isomérica Z. e (b) a estrutura molecular da forma reduzida, em vermelho esta evidenciada a região que sofre redução.

O sulindaco, entretanto, é um pró-fármaco, ou seja, para que apresente a ação biológica deve sofrer uma prévia metabolização e, no caso, apenas quando seu grupo sulfóxido é reduzido a sulfeto é que há a ação biológica (Figura 9). Tal metabolização só ocorre após a absorção do

sulindaco para a corrente sanguínea levando-o para o fígado, onde enzimas específicas o reduzem, permitindo assim que o metabólito faça sua ação na via metabólica do ácido araquidônico e essencialmente agindo na inibição, não específica, das ciclooxigenases 1 e 2 (COX 1 e COX 2) (Vane e M., 1998). Essa ação não específica pode gerar diversos efeitos colaterais, uma vez que a COX 1 possui funções fisiológicas importantes, como por exemplo a sua participação na proteção da mucosa do trato gastrointestinal (Green).

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar, através da espectroscopia Raman, a extensão dos processos inflamatórios nos tecidos biológicos, desencadeados pela inserção de implantes de compostos sólidos lamelares.

Dentre os objetivos específicos estão:

- 1) O acompanhamento temporal do processo inflamatório e reparo tecidual natural em tecidos musculares pós-trauma cirúrgico por microscopia Raman.
- 2) Avaliação por microscopia Raman do processo inflamatório causado por implantes cirúrgicos intramusculares de matrizes de HDL, com e sem fármaco intercalado, e sua propriedade de biocompatibilidade;
- 3) Análise dos implantes de HDL visando a identificação dos efeitos sofridos por ação do organismo.
- 4) Avaliar a eficiência da liberação modificada do fármaco no tecido através da resposta inflamatória observada.

3. Parte experimental

3.1. Proteínas

As proteínas foram a fibrina de plasma humano, fibrinogênio extraído de plasma de ratos (60 – 80% de proteína), fibronectina extraído de plasma de ratos, osteopontina de ratos (pureza maior que 95%), colágeno humano do tipo I seguindo a nomenclatura de Bornstein e Traub (pureza de aproximadamente 95%), colágeno de placenta humana do tipo III (Bornstein e Traub) (pureza maior que 90%), colágeno de placenta humana do tipo IV (Bornstein e Traub) (pureza maior que 85%), vitronectina extraída de plasma de ratos (conteúdo proteico aproximado de 10%), trombospondina humana (10U) (pureza de 98%) e SPARC/osteonectina humana (50U) (pureza superior a 97% de mistura proteica), todas adquiridas da Sigma-Aldrich.

Para caracterização utilizou-se a espectroscopia de absorção no infravermelho e espectroscopia Raman. Todas as proteínas foram utilizadas sem tratamento prévio.

3.2. Sulindaco

Sulindaco Z ou **(Z)-5-Fluoro-2-methyl-1-[p-(methylsulfinyl)benzylidene]indene-3-acetic acid** com fórmula molecular $C_{20}H_{16}O_3FS$ utilizado nas sínteses e nas caracterizações foi obtido diretamente da Sigma-Aldrich. Para caracterização do fármaco utilizou-se espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia Raman e difração de raios X.

3.3. Síntese e caracterização dos hidróxidos duplos lamelares (HDLs) com e sem sulindaco

As matrizes de HDL utilizadas, tanto de zinco quanto de magnésio, ambas com sulindaco e com íons cloreto intercalados no espaço interlamelar foram sintetizadas pela rota da

co-precipitação e fornecidas pelo Laboratório de Sólidos Lamelares coordenado pela Profa. Dra. Vera R. L. Constantino do IQUSP.

Para as sínteses, foram utilizados, sem tratamento prévio, sulindaco (Aldrich), cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Aldrich), cloreto de zinco (ZnCl_2 , Aldrich), cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Aldrich) e hidróxido de sódio (NaOH , Merck).

A síntese das matrizes intercaladas com íons cloreto ($\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}/\text{Cl}^-$ e $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}/\text{Cl}^-$, na razão molar $\text{M}^{2+}/\text{Al} = 2$), consistiu na mistura de soluções 0,067 mol/L do cátion bivalente, M^{2+} , e outra 0,033 mol/L do cátion trivalente, M^{3+} , (a concentração total de cátions foi de 0,1 mol/L) e posterior adição de 200 mL desta mistura, lentamente e sob intensa agitação, à 100 mL H_2O deionizada com pH adequado para a formação dos HDLs, ou seja, pH = 7,5 para matriz de $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}/\text{Cl}^-$ e pH = 9,5 para matriz de $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}/\text{Cl}^-$. A síntese foi conduzida sob atmosfera de nitrogênio e termostatizada a 50 °C. O pH foi mantido com adições controladas de solução de NaOH 0,2 mol/L. Após o término da adição dos reagentes, a suspensão foi mantida sob intensa agitação por 24 horas, em atmosfera de nitrogênio e temperatura de 50 °C. Depois de isolado por centrifugação e lavado com água deionizada, o sólido resultante foi seco a temperatura ambiente. Todo o processo foi descrito na tese de doutorado de Rocha (2015).

As sínteses das matrizes intercaladas com sulindaco ($\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}/\text{Sul}^-$ e $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}/\text{Sul}^-$) seguiram um procedimento similar ao citado acima, também descrito por Rocha (2015), para fármacos monovalentes de carga negativa. O sulindaco foi solubilizado em solução de NaOH (pH = 7,5 ou 9,5) de modo a formar uma solução 0,01 mol/L, que foi mantida sob agitação vigorosa, atmosfera de nitrogênio e temperatura de 50 °C. Após a lenta adição da solução contendo M^{2+} e Al^{3+} , aproximadamente 1 mL/min, o sistema foi mantido por 24 horas nesta temperatura, sob agitação e atmosfera de N_2 . Em seguida foi deixado resfriar por 12 horas, a

suspensão foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O sólido resultante foi lavado com água deionizada e seco em dessecador sob pressão reduzida.

Após secagem, os materiais foram triturados e submetidos a caracterização estrutural e análise química. As quantidades de C e H foram determinadas por análise elementar; S, Al e Mg por ICP OES e H₂O por análise térmica.

A partir desses dados foram propostas fórmulas mínimas para os compostos como segue: $[\text{Zn}_{2,2}\text{Al}(\text{OH})_{6,4}]\text{Cl}_{1,1}5\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Mg}_{2,1}\text{Al}(\text{OH})_{6,2}]\text{Cl}_{0,98}\text{H}_2\text{O}$ para os inorgânicos e para as matrizes com sulindaco intercalado $[\text{Zn}_{2,0}\text{Al}(\text{OH})_{6,0}](\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{FS})_{0,9}\text{Cl}_{0,1}2,2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Mg}_{1,9}\text{Al}(\text{OH})_{5,8}](\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{FS})_{0,9}\text{Cl}_{0,1}1,4\text{H}_2\text{O}$.

A partir das matrizes foram feitas pastilhas em pastilhador de pressão e então feitas a caracterização por espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman e com o pó, a difração de raios X.

3.4. Procedimentos cirúrgicos *in-vivo*

Os experimentos *in vivo*, foram realizados no Laboratório de Pesquisa Experimental, coordenado pelo Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh obedecendo todos os protocolos para pesquisa experimental estabelecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EPM/UNIFESP (CEUA Nº 873141013) Para os implantes as pastilhas (5,0 mm de diâmetro x 2,0 mm de espessura) utilizadas foram as de HDL com cloreto no seu interstício lamelar (HDL-Cl) e HDL com sulindaco intercalado (HDL-Sul), sendo a matriz de HDL de zinco/alumínio ou magnésio/alumínio. Os experimentos foram feitos em duplicata.

3.4.1. Implantes dos hidróxidos duplos lamelares em animais

Os animais usados foram ratas Wistar-EPM, fêmeas, com peso entre 200 a 250 g, foram submetidos a anestesia geral com ketamina e xilazina (4:1), 0,1 mL/100 g (peso do animal), via intramuscular. Os implantes das pastilhas foram realizados após a antissepsia, incisão cutânea na linha media de aproximadamente 3 cm, divulsão do espaço subcutâneo, incisão paramediana do músculo oblíquo externo de 0,5 cm, criação de espaço entre os músculos oblíquo externo de dimensão suficiente para o implante, implantação da pastilha e fechamento da abertura do músculo oblíquo externo. A seguir, o mesmo procedimento foi realizado no lado contralateral para implantação de outra pastilha a ser comparada. Como controle, foi realizado o mesmo processo de implantação na região do quadrante superior esquerdo, distante do implante anterior, porém sem a presença de implante.

O fechamento da incisão cutânea foi realizado com sutura contínua após os processos anteriormente descritos. As pastilhas foram implantadas em regiões musculares distintas para que não ocorressem interações entre si. Desta forma, duas amostras e um controle puderam ser realizadas num mesmo animal.

3.4.2. Reoperação para obtenção das amostras das matrizes implantadas e do controle

As cirurgias de reoperação para retirada do tecido muscular e das matrizes foram realizadas nos animais após 7, 21, 28 e 35 dias de pós-operatório sob a mesma anestesia geral. O procedimento da coleta foi realizado após a incisão ampla em formato de “U” da pele seguido pela divulsão da mesma até a completa exposição dos três locais de implantação. A seguir, foi realizada, de forma macroscópica, a avaliação dos locais de implante, e posteriormente, foi feita a

laparotomia mediana para a avaliação dos locais de implante pela face peritoneal com e sem a transiluminação com luz branca e registro fotográfico.

A seguir, foi realizada a coleta da parede abdominal, contendo a totalidade da parede abdominal, abrangendo os locais de implantação (fragmento de 1,5 cm por 2 cm, contendo em seu centro a região de controle ou pastilha). Ao final dos procedimentos, o animal foi sacrificado pela hipovolemia decorrente da secção da aorta abdominal.

Após a coleta, as camadas do músculo oblíquo externo e interno foram separadas para facilitar a focalização do laser no local de interesse. As amostras foram mantidas em solução isotônica a 4 °C (Ringer lactato, JP Industria Farmacêutica S.A.), para manter em condições próximas às encontradas no sangue e minimizar a degradação até o início da caracterização por espectroscopia Raman.

3.4.3. Caracterização Raman dos tecidos *ex vivo*

Ao início da caracterização, os tecidos foram lavados com água deionizada para retirada de excesso de solução isotônica e colocados diretamente sob o laser. A potência do laser foi mantida próxima de 10 mW com a opção “line focus” ativada, aumentando a área focal para um retângulo de 30 µm por 5 µm, com 3 acumulações e tempo de exposição máxima de 10 segundos cada uma, sendo tais parâmetros otimizados para que não houvesse degradação nem muita desidratação do tecido. De cada amostra foram obtidos no mínimo 10 espectros de diferentes pontos em contato com a região dos implantes.

3.5. Análise histológica

Os fragmentos de tecidos musculares foram conservados por imersão em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4. Após a fixação, as amostras foram submetidas a duas lavagens por imersão no mesmo tampão por um período de 10 minutos. Seguiu-se desidratação, em série crescente de etanol, nas concentrações 50% a 100%, durante 10 minutos a cada passagem. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas por aproximadamente 12 horas (*overnight*) em solução de etanol absoluto e historresina (Technovit 7100®) em partes iguais (1:1). Em seguida, as amostras foram imersas em resina pura por um período de 4 horas, e posteriormente incluídas em resina com polimerizador em moldes plásticos apropriados. Os cortes foram equidistantes de 3 μm de espessura e foram obtidos com auxílio de micrótomo American Optical model 820® e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (Michalany, 1990) e *Picrosirius Red* (Tolosa, et al., 2003). A observação e registro das imagens foram realizados sob microscópio de luz Carl-Zeiss Axio Scope.A1® e *software* de captura de imagem Zen®.

3.6. Instrumentação

3.6.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Para caracterização das proteínas foi utilizado o equipamento Bruker FTIR, modelo ALPHA com o acessório de ATR de única reflexão com cristal de diamante com resolução espectral de 4 cm^{-1} , o que permitiu que as amostras sólidas de proteínas fossem analisadas sem nenhum tratamento prévio evitando assim sua desnaturação. Nas demais amostras como as

matrizes de HDL e tecidos biológicos, tal técnica fica comprometida devido à absorção das moléculas de água presentes.

3.6.2. Espectroscopia Raman

Muito comumente tecidos biológicos e algumas matrizes inorgânicas apresentam um fundo de luminescência intrínseco que se sobrepõe às bandas Raman. Para contornar esse problema foram utilizados equipamentos com radiação de comprimento de onda de excitação no infravermelho próximo (NIR). Utilizou-se então o equipamento FT-Raman Bruker, modelo RFS 100/S, dotado de detector de Ge (resfriado com N₂ líquido) e laser de Nd³⁺/YAG para excitação em 1064 nm e resolução de 4 cm⁻¹ para caracterização das matrizes e das proteínas e para a análise das proteínas e dos tecidos biológicos, já que a discriminação espacial via microscópio se faz necessária, utilizou-se o microscópio Renishaw inVia Reflex, equipado com câmera CCD (Renishaw, 600x400 pixels) refrigerado termoeletricamente e acoplado a um microscópio Leica modelo DM2500M; a linha laser em 785 nm (laser de diodo, Renishaw) foi focalizada na amostra por uma objetiva Leica x50 (abertura numérica de 0,75).

3.6.3. Difratometria de raios X

Todos os difratogramas foram obtidos pelo método do pó, no qual as amostras devem ser previamente maceradas e distribuídas em porta-amostra de vidro. O equipamento utilizado para obtenção dos difratogramas de raios X foi um difratômetro Rigaku modelo Miniflex, que operou com tensão de 30 kV e corrente de 15 mA. A radiação utilizada foi a K α da fonte de cobre com filtro de Ni, com comprimento de onda definido em 1,541 Å. O intervalo de valores de 2 θ foi de 1,5 a 70°, com varreduras feitas em passos de 0,03°/s.

3.7. Simulações vibracionais e métodos estatísticos

3.7.1. Simulações vibracionais

As simulações vibracionais das diferentes configurações que a molécula de sulindaco pode se estruturar foram feitas utilizando o programa Gaussian09 (Frisch, *et al.*, 2009). Nos cálculos foi empregado o método DFT (*Density Functional Theory*) com o funcional híbrido B3LYP com base atômica 6-31+g(d,p)

3.7.2. Análise espectral

Todos os espectros teóricos e experimentais Raman, FTIR e difratogramas de raios X foram analisados utilizando-se o programa GRAMS/AI versão 9.1 (Thermo Scientific).

3.7.3. Método estatístico

Os espectros Raman obtidos dos experimentos com tecidos biológicos foram analisados utilizando o pacote estatístico Unscrambler X, versão 10.1 (Camo). A metodologia utilizada foi uma seleção de 5 espectros de cada período de pós-operatório, sem tratamento prévio, para realizar os tratamentos de alisamento seguido de uma correção de linha base igual para todos os espectros e uma normalização por *De-Trending*. Após tratamentos, a análise foi feita por PCA (*Principal Component Analysis*) com método SVD (*Singular Value Decomposition*) com centralização dos dados com a média.

4. Resultados e Discussão

4.1 Sulindaco

4.1.1. Caracterização por espectroscopia vibracional e difratometria de raios X

A molécula de sulindaco (Sul) apresenta dois estereoisômeros, a forma Z e E, sendo a forma Z reportada como tendo ação biológica anti-inflamatória e analgésica (Lemke e Williams, 2013). Esse estereoisômero biologicamente ativo apresenta dois possíveis tipos de polimorfos puros, tipo I e tipo II (Plakogiannis e McCauley, 1984), além de seus solvatos (Grzesiak e Matzger, 2007; Llinàs, *et al.*, 2007; Tros De Ilarduya, *et al.*, 1997); tal polimorfismo influencia diretamente na solubilidade, estabilidade térmica, densidade, compactabilidade e até a biodisponibilidade (Sánchez-González, *et al.*, 2015), gerando a necessidade de caracterização do fármaco que foi obtido comercialmente para sínteses posteriores, já que os dados de caracterização são escassos e pouco discutidos na literatura e a confirmação do estereoisômero ativo biologicamente é essencial para este trabalho.

A caracterização do Sul comercial foi feita utilizando as técnicas de espectroscopia Raman, no infravermelho e difratometria de raios X para determinação do polimorfo precursor das sínteses de intercalação do fármaco nas matrizes de hidróxidos duplos lamelares (HDL). Os espectros Raman e no infravermelho são mostrados na Figura 10 e 11 respectivamente.

Figura 10: Espectro FT-Raman ($\lambda_0 = 1064$ nm) do Sul; em destaque é mostrada a região de estiramentos C-H.

Figura 11: Espectro FTIR-ATR do sulindaco.

Os espectros Raman de polimorfos do sulindaco foram reportados apenas por dois autores (Grzesiak e Matzger, 2007; Roy, *et al.*, 2013), mas em nenhum deles as atribuições vibracionais são reportadas e apenas é feita a comparação entre os espectros dos diferentes polimorfos (tipo I e tipo II). A partir dessas comparações foi possível verificar que nossos espectros são similares aos reportados para o polimorfo do tipo II, principalmente pela evidência das bandas de maior intensidade localizadas em 1210, 1188, 1134, 1120, 1088, 592, 541 e 488 cm^{-1} .

Na literatura são reportados os espectros IR dos polimorfos do tipo I e II (Plakogiannis e McCauley, 1984; Sánchez-González, *et al.*, 2015; Tros De Ilarduya, *et al.*, 1997), mas assim como para os espectros Raman, as atribuições são poucas e atenta-se apenas às diferenças espectrais como posições e intensidades de bandas para diferenciação das espécies cristalinas. Comparando-se os espectros IR encontrados na literatura e os obtidos experimentalmente, a partir da posição as bandas mais intensas localizadas em 1600, 1587, 1268 (dímero), 1085 e 1071 cm^{-1} , nota-se a clara semelhança do espectro por nós obtido com os espectros do polimorfo tipo II.

O Sul é uma molécula com 42 átomos e que apresenta $3N-6$ modos vibracionais sendo N o número de átomos (Sala, 2008). Temos pela teoria 120 modos normais além dos modos de rede gerados pelas formas cristalinas tornando assim a atribuição vibracional uma tarefa bastante complexa.

A fim de auxiliar tal atribuição e verificar qual o efeito da estereoisomeria no espectro vibracional, foi feito o cálculo teórico DFT (funcional B3LYP com base 6-31+g(d,p)) da molécula do fármaco em sua forma Z (Koo, *et al.*, 1985), e a partir do qual foram obtidos os espectros vibracionais teóricos Raman e no infravermelho mostrados na Figura 12.

Figura 12: Espectros vibracionais teóricos da molécula de sulindaco calculados por DFT. Acima encontra-se a simulação do espectro no infravermelho e abaixo a simulação do espectro Raman.

Os espectros Raman e no infravermelho calculados mostraram boa concordância com os respectivos espectros experimentais, permitindo que sejam utilizados como base para a atribuição vibracional, a qual é mostrada na Tabela 1.

A região abaixo de 400 cm^{-1} não foi considerada no processo de atribuição vibracional já que experimentalmente o equipamento FTIR em que a análise foi conduzida não permite aquisição de informações nessa faixa espectral, devido a sua óptica de KBr, além disso, essa região de baixo número de onda fornece informações de modos de rede dos cristais, impossibilitando a comparação com as simulações computacionais, uma vez que em tais simulações a geometria da molécula do sulindaco é otimizada para a espécie isolada no vácuo.

Tabela 1: Atribuições tentativas para os espectros Raman e no infravermelho baseados nas frequências vibracionais calculadas e corrigidas (fator de correção = 0,9679).

ν / cm^{-1}				
$\nu_{\text{calculado}}$	$\nu_{\text{corrigido}}$	Raman _{exp}	IR _{exp}	Atribuição tentativa
3751	3631	3240	ca. 3400	$\nu(\text{O-H})$
3230	3126	3107	-	$\nu(\text{C-H})$
3210	3107	3062	3064	$\nu(\text{C-H})$
3184	3082	3000	3001	$\nu(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
3126	3026	2986	-	$\nu(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
3056	2958	2935	2959	$\nu(\text{C-H})_{\text{sim metila}}$
3033	2936	2916	2914	$\nu(\text{C-H})_{\text{sim metila}}$
-	-	-	2500 -2800	(C-O)-H dímero*
1822	1764	1800	1694	$\nu(\text{C=O})$
1677	1623	1620	1621	$\nu(\text{C=C})_{\text{indol junção}}$
1665	1612	1615	-	$\nu(\text{C=C})_{\text{indol}}$
1647	1594	-	1601	$\nu(\text{C=C})_{\text{ant. arom indol}}$
1636	1583	1590	-	$\nu(\text{C=C})_{\text{ant. arom}}$
1631	1579	-	1587	$\nu(\text{C=C})_{\text{ant. arom indol}}$
1525	1476	1493	1490	$\nu(\text{C=C})_{\text{ant. arom}}$
1505	1457	1471	1469	$\delta(\text{C-H})_{\text{indol}} + \delta(\text{C-H})_{\text{metila}}$
1495	1447	-	1459	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}} + \delta(\text{C-H}_2)$
1471	1424	1437	-	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}} + \delta(\text{C-H}_2) + \delta(\text{C-H})_{\text{indol}}$
1435	1389	-	1406	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
1427	1381	1390	-	$\delta(\text{C-H})_{\text{sim metila}}$
1410	1365	-	1373	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}} + \delta(\text{C-H}_2) + \delta(\text{C-H})_{\text{indol}}$
1386	1342	1343	1341	$\delta(\text{C-H}_2) + \delta(\text{O-H})$
1370	1326	1325	1325	$\delta(\text{C=C-H}) + \nu(\text{C=C})_{\text{ant. arom indol}}$
1360	1316	1297	1286	$\delta(\text{C-H}_2) + \delta(\text{C-O-H}) + \delta(\text{C-H})_{\text{sim metila}}$
-	-	-	1270	(C-O)-H dímero*
1289	1248	1235	1235	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{metila}} + \delta(\text{C-H}_2) + \delta(\text{C=C-H})$
1239	1199	1210	1209	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{metila}} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant.}} + \delta(\text{C=C-H}) + \delta(\text{C-O-H})$
1228	1189	1188	1188	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{metila}} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant.}} + \delta(\text{C=C-H}) + \delta(\text{C-O-H})$
1204	1165	-	-	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. arom}}$
1194	1156	-	1155	$\nu(\text{C-F})^* + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant.}} + \delta(\text{C-H})_{\text{sim arom}}$
1162	1125	1134	-	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. arom}} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant.}} + \delta(\text{C-O-H})$
1143	1106	1087	1087	$\delta(\text{C-O-H}) + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{sim}}$
1135	1099	-	1070	$\delta(\text{C-H})_{\text{sim arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
1049	1015	1005	1002	$\nu(\text{S=O})^* + \delta(\text{C-H})_{\text{sim arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
998	966	980	-	$\delta(\text{C-H})_{\text{fora do plano arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
971	940	-	950	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}}$
950	920	915	915	$\delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}} + \nu(\text{S=O})$
930	900	891	890	$\delta(\text{CO}_2\text{H})_{\text{fora do plano}} + \delta(\text{C-H}_2)_{\text{ant.}} + \delta(\text{C-H})_{\text{sim arom}}$

910	881	879	877	$\delta(\text{C-H})_{\text{fora do plano arom}} + \delta(\text{C-H})_{\text{ant. metila}} + \delta(\text{C}=\text{C-H})$
892	863	858		$\delta(\text{C}=\text{C-H})_{\text{fora do plano}} + \delta(\text{C-H})_{\text{metila}}$
882	854		842	$\delta(\text{C-H})_{\text{fora do plano arom}} + \delta(\text{C-H}_2) + \delta(\text{O-H})$
862	834	829	827	$\delta(\text{C-H})_{\text{fora do plano}} + \delta(\text{C-H}_2) + \delta(\text{O-H})$
840	813	815	808	$\delta(\text{C-H})_{\text{fora do plano arom}}$
825	799	-	788	$\delta(\text{C-H})_{\text{fora do plano arom}}$
778	753	755	-	$\delta(\text{C-H})_{\text{fora do plano arom}} + \delta(\text{C-C})_{\text{transl indol}}$
759	735	733	730	$\delta(\text{C}=\text{C})_{\text{transl arom}}$
736	712	713	705	$\delta(\text{C-C-C})_{\text{fora do plano transl arom}} + \delta(\text{C-H})$
715	692	700	-	$\delta(\text{C}=\text{C})_{\text{transl}} + \delta(\text{C-H})$
677	655	-	665	$\delta(\text{C-O-H})_{\text{transl}} + \delta(\text{C-H})$
673	651	662	-	$\delta(\text{C-O-H})_{\text{transl}} + \delta(\text{C-H})$
648	627	631	637	$\nu(\text{H}_3\text{C-S})$
637	617	624	624	$\delta(\text{C-O-H})_{\text{transl}} + \delta(\text{C}=\text{C-H})_{\text{fora do plano}}$
627	607	615	615	$\delta(\text{O-H}) + \delta(\text{C-C-H})_{\text{arom}}$
613	593	593	589	$\delta(\text{O}=\text{C-O-H}) + \delta(\text{C-H})_{\text{transl}}$
579	560	541	539	$\delta(\text{O}=\text{C-O-H}) + \delta(\text{C-H})_{\text{arom transl}} + \delta(\text{C-H})_{\text{transl}}$
498	482	488	-	$\delta(\text{C-S-C}) + \delta(\text{C}=\text{C-H})_{\text{trans}} + \delta(\text{C-H})$

ν = estiramento, δ = deformação angular, ant. = antissimétrico, sim. = simétrico, arom. = anel aromático, transl. = translação, * referente a atribuição encontrada na literatura (Plakogiannis e McCauley, 1984).

Foram obtidos também os espectros Raman e FTIR do fármaco em sua forma desprotonada, sal de sódio (Na-Sul), que são mostrados na Figura 17.

Figura 13: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$) e FTIR-ATR do sal de sulindaco (Na-Sul); * indica a banda Raman mais afetada (1183 cm^{-1}); # indica as bandas IR que apareceram (1554 e 1376 cm^{-1}).

De um modo geral, para o espectro Raman mostrado na Figura 13, o que se observa nitidamente é a diminuição da intensidade da banda em 1183 cm^{-1} que foi atribuída a combinação de diferentes modos vibracionais, dentre eles a deformação angular $\delta(\text{C-O-H})$ que não está mais presente devido a perda do átomo de hidrogênio na desprotonação.

Em relação ao espectro FTIR mostrado na Figura 13, é possível principalmente o desaparecimento da banda que era localizada em 1694 cm^{-1} , antes atribuída ao estiramento $\nu(\text{C=O})$ presente na estrutura do grupo ácido carboxílico, e o aparecimento de duas bandas de intensidade muito elevada localizadas em 1554 e 1376 cm^{-1} que podem ser atribuídas aos estiramentos antissimétrico e simétrico do grupo (COO^-) , respectivamente.

A fim de confirmar que o polimorfo do sulindaco é o do tipo II, como indicado por Raman e IR, foi feita a difratometria de raios X da amostra o que gerou o padrão de difração mostrado na Figura 14.

Figura 14: Difratograma de raios X do sulindaco. As intensidades foram normalizadas para o pico mais intenso com 2θ igual a $21,4$ graus.

A partir do difratogramas obtido, os picos de difração foram comparados com valores obtidos na literatura (Grzesiak e Matzger, 2007), como mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de 2θ e intensidades normalizadas para os polimorfos do sulindaco do tipo I (SUL I) e II (SUL II) e do sulindaco comercial (SUL exp).

SUL I *		SUL II *		SUL exp	
2 θ / graus	I/I ₀ %	2 θ / graus	I/I ₀ %	2 θ / graus	I/I ₀ %
7,1	5,7	9,6	54,8	9,6	16,4
10,7	36,4	12,3	16,2	12,3	10,3
11,8	10,9	14	24,1	14,1	11,8
13	35,8	15,1	28,5	15,2	78,3
14,3	36,1	16,4	26,8	16,4	17,6
17,5	23,8	18,5	100	18	14,5
18,5	100	19,4	8,3	18,5	42,1
19,8	24,6	21,4	81,6	19,5	8
21,3	63	22,5	29,4	21,4	100
22,7	18,1	24	88,2	22,5	15,8
23,9	86	24,9	28,1	22,9	23,2
25,6	19,5	26,3	30,7	24	32
26,4	51,3	27,1	15,4	24,9	19,4
28,5	14,6	28,4	17,5	25,8	9,7
29,4	5,4	29,2	9,6	26,5	18
30	9,5	30,2	11,4	27,2	17,5
32,8	11,2	30,5	9,2	28,5	41,2
33,9	6,6	32,1	8,3	29,3	11,3
40	8,6	33	11	30,2	13,1
40,7	4,9	34,3	4,4	30,7	18,6
48,5	4	35	13,2	32,2	24,5
		36,1	7,9	33	13,5
		38,5	7,5	35	11,9
		39,9	8,3	36,1	10,2
		40,4	11	38,6	28,7
		41	7,5	40	18,2
		43	7,5	40,5	26,5
		44,6	4,4	41,1	9,5
		48,5	6,1	43	8,9
		49,3	6,1	43,8	19,4
				44,6	9,3
				48,6	10,9
				49,3	11,1

* valores obtidos de Grzesiak e Matzger, 2007.

Como observado na Tabela 2, as posições dos picos de difração obtidos experimentalmente estão, em sua grande maioria, em concordância com as posições reportadas para o polimorfo na forma II apesar de suas intensidades normalizadas variarem entre si. O fenômeno de variação de intensidades relativas e surgimento de novos picos que pode acontecer devido à variação do grau de cristalinidade da amostra, tamanho de partícula e da orientação preferencial, fatores muito comuns em polimorfos de diversos fármacos. Araujo (2009) e Antonio (2010) ao investigarem tibolona, reportaram o problema encontrado durante a análise por XRD relacionado à orientação preferencial dos cristais e ao tamanho de partícula.

4.2. Hidróxidos duplos lamelares (HDL)

Como foi descrito anteriormente nessa dissertação, um dos objetivos do trabalho que foi desenvolvido consistia em avaliar o efeito da inserção de implantes de HDL com e sem fármaco anti-inflamatório sulindaco em tecidos musculares de ratos, particularmente do ponto de vista da resposta inflamatória e posteriormente recuperação do tecido. A síntese dos HDLs foi feita no Laboratório de Sólidos Lamelares coordenado pela Prof.^a Vera R. L. Constantino do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela aluna de doutorado Michele A. Rocha. Após o preparo dos hidróxidos duplos lamelares seguiu-se a caracterização feita por FT-Raman e XRD. Dois tipos de matrizes foram preparadas, uma com cátions de zinco e alumínio e outra de cátions de magnésio e alumínio, ambas da razão molar de 2:1 (M^{2+}/M^{3+}).

4.2.1. Caracterização por espectroscopia vibracional e difratometria de raios X das matrizes de HDL ($\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$)

Para a matriz de HDL de zinco e alumínio com cloreto intercalado ($\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$), a fórmula proposta a partir de dados obtidos por ICP-OES foi de $[\text{Zn}_{2,2}\text{Al}(\text{OH})_{6,4}]\text{Cl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$. Essa matriz foi caracterizada por XRD e por espectroscopia Raman e no infravermelho. Os espectros FT-Raman e FTIR são mostrados na Figura 15.

Figura 15: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$) e FTIR-ATR do HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$.

Como mostrado na Figura 15, o espectro Raman apresenta bandas características de HDL de zinco e alumínio localizadas em $548,7$ e $490,1 \text{ cm}^{-1}$, atribuídas a estiramentos Zn-O-Al e Al-O-Al, respectivamente, localizados na estrutura das lamelas do HDL, de modo análogo ao reportado na literatura (Burrueco, *et al.*, 2013; Palmer, *et al.*, 2008) para hidróxidos duplos lamelares de magnésio e alumínio (Mg_2Al); é interessante notar que Palmer em publicação posterior (Palmer, *et al.*, 2009), altera as atribuições para estiramentos do tipo $\text{M}^{\text{II}}\text{-O-M}^{\text{II}}$ e Al-O-

Al para as mesmas bandas encontradas para a mesma matriz estudada (HDL de Mg_2Al) em seu artigo de 2008. Nesta dissertação serão seguidas as atribuições de Burrueco e de Palmer em 2008, devido à maior similaridade entre as matrizes estudadas pelos autores e as utilizadas neste trabalho ($M^{\text{II}}/M^{\text{III}} = 2$). As bandas Raman localizadas abaixo de 400 cm^{-1} , ou seja, 364, 260, 203 e 148 cm^{-1} são reportadas por diversos grupos (Burrueco, *et al.*, 2013; Mora, *et al.*, 2014; Palmer, *et al.*, 2009) como sendo devidas a modos de deformação angulares de ligações do tipo M-OH e a banda em 148 cm^{-1} é a um conjunto de deformações angulares O-M-O, sendo M zinco ou alumínio. As atribuições das bandas deste HDL de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}$ são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Atribuições das bandas Raman encontradas nos espectros dos HDLs de zinco e de magnésio.

$\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}$	$\text{Mg}_2\text{Al}_2\text{Cl}$	Atribuição das bandas Raman
147,8	-	$\delta(\text{O-Zn-O})$
-	153,7	$\delta(\text{O-Mg-O})$
203	-	$\delta(\text{Zn-OH})$
260	-	$\delta(\text{Zn-OH})$
-	304	$\delta(\text{Mg-OH})$
-	364	$\delta(\text{Mg-OH})$
-	394	$\delta(\text{Mg-OH})$
	478	$\nu(\text{Al-O-Al})$
490	-	$\nu(\text{Al-O-Al})$
549	-	$\nu(\text{Zn-O-Al})$
-	556	$\nu(\text{Mg-O-Al})$
1060	1061	$\nu_1(\text{CO}_3)^{2-}$
3337	3339	$\nu(\text{O-H})$

ν = estiramento, δ = deformação angular; Atribuições baseadas em Mora, *et al.* (2014) Burrueco, *et al.* (2013) e Palmer, *et al.* (2008).

A Figura 15 também apresenta o espectro FTIR do HDL de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$, mas sem a região espectral abaixo de 400 cm^{-1} devido a limitação instrumental da óptica de KBr do equipamento. No espectro FTIR mostrado nota-se nitidamente que a composição de bandas na região espectral abaixo de 1100 cm^{-1} é muito complexa por apresentar muitas bandas sobrepostas já que é uma região em que normalmente apresenta bandas de deformações angulares e modos translacionais, tornando necessário o processo de deconvolução espectral a fim de tentar obter mais informações da composição de bandas nessa região. A Figura 16 mostra o espectro FTIR da matriz de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ junto com o ajuste de curva da região de 1100 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

Figura 16: Espectro FTIR-ATR do HDL de zinco e alumínio junto com sua deconvolução espectral da região de 1100 a 400 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em vermelho, azul e verde, respectivamente.

Já a região entre 1900 e 1100 cm^{-1} um número de bandas menor é observado, tais bandas possuem forma assimétrica, o que evidencia que há a presença de bandas de menor intensidade que contribuem na região tornando a composição total assimétrica. A deconvolução espectral desta região é mostrada na Figura 17.

A região acima de 1900 cm^{-1} tanto para o espectro FTIR quanto para o Raman não nos traz informações relevantes já que as únicas bandas observadas são as localizadas em 3376 e 3337 cm^{-1} para FTIR e FT-Raman, respectivamente, atribuídas a estiramentos O-H estruturais e das moléculas de água que estejam adsorvidas nas lamelas ou localizadas no espaço interlamelar.

Figura 17: Espectro FTIR-ATR do HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ junto com sua deconvolução espectral da região de 1900 a 1100 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em vermelho, azul e verde, respectivamente.

A partir da posição das bandas determinadas por deconvolução espectral foi possível montar uma tabela para atribuições tentativas para o HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ baseada em comparações encontradas na literatura (Frost, *et al.*, 2014; Kloprogge, *et al.*, 2004; Kloprogge, *et al.*, 2005), mostrada na Tabela 4.

Outra discussão encontrada na literatura envolvendo hidróxidos duplos lamelares é referente ao íon carbonato interlamelar e a sua interação com a matriz de HDL (Burrueco, *et al.*, 2013; Frost, *et al.*, 2014; Kloprogge, *et al.*, 2004; Kloprogge, *et al.*, 2005; Mora, *et al.*, 2014; Paikaray e Hendry, 2012; Palmer, *et al.*, 2008; Palmer, *et al.*, 2009).

Tabela 4: Atribuições tentativas das bandas no infravermelho encontradas nos espectros dos HDLs de zinco e de magnésio.

Zn ₂ Al.Cl	Mg ₂ Al.Cl	Atribuição tentativa das bandas do FTIR
-	412	$\delta(\text{Mg-O-H})_{\text{transl.}}$
421	-	$\delta(\text{Zn-O-H})_{\text{transl.}}$
-	438	$\delta(\text{Al-O-H})_{\text{transl.}}$
-	512	$\nu(\text{Al-O-Al})$
544	543	$\nu(\text{M-O-Al})$
598	588	$\delta(\text{Al-OH})_{\text{transl.}}$ ou $\delta(\text{M-OH})_{\text{transl.}}$
-	644	$\delta(\text{Mg-OH})_{\text{transl.}}$
667	-	$\nu_{4a}(\text{CO}_3^{2-})$
724	726	$\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$
777	774	$\delta(\text{Al-OH})_{\text{transl.}}$
854	856	$\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$
921	-	$\delta(\text{Al-OH})_{\text{transl.}}$
-	941	$\delta(\text{Zn-OH})$
1358	1358	$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$
1398	1401	$\nu_{3a}(\text{CO}_3^{2-})$
1542	1547	$\delta(\text{H}_2\text{O})$
1624	1630	$\delta(\text{H-O-H})$
3370	3376	$\nu(\text{O-H})$

“M” pode ser Zn ou Mg; ν = estiramento, δ = deformação angular, transl. = translação, a= interação com a matriz; Atribuições baseadas em Frost, *et al.* (2014), Klopogge, *et al.* (2004) e Klopogge, *et al.* (2005).

O íon carbonato em sua forma isolada apresenta seis modos normais de vibração, sendo 2 deles duplamente degenerado (E), o modo ν_1 referente ao estiramento simétrico no plano (A_1') ativo apenas no Raman, o modo ν_2 que corresponde à deformação angular simétrica fora do plano (A_2'') ativo apenas no IR, o modo ν_3 de deformação angular antissimétrica no plano (E') ativo no Raman e no IR e o modo ν_4 de estiramento antissimétrico (E') também ativo no Raman e no IR (Mora, *et al.*, 2014; Nakamoto, 1963; Sala, 2008).

Inicialmente, o íon carbonato livre pertence ao grupo de ponto D_{3h} e pode perder simetria conforme interage com a carga positiva residual da lamela do HDL podendo baixar sua simetria para D_3 , C_{2v} ou até C_s . A partir da análise da atividade das bandas vibracionais do espectro no infravermelho em conjunto com o espectro Raman e seus eventuais desdobramentos é possível identificar a qual grupo de ponto o íon carbonato intercalado pertence e consequentemente o modo como ele esta interagindo com a matriz inorgânica. Assim, por exemplo, o modo ν_1 , ativo somente no espectro Raman para a espécie com simetria D_{3h} , passa a ser ativo também no IR, caso a simetria do íon carbonato passe a ser C_{2v} ou C_s . Da mesma forma, os modos que são duplamente degenerados (ν_3 e ν_4) tem a degenerescência rompida com a diminuição da simetria, o que causa sua separação de 2 modos distintos, ativos tanto no espectro no IR quanto no Raman. Para determinação do grupo de ponto usa-se a tabela de correlação entre grupos de ponto mostrada na Tabela 5 (Nakamoto, 1963).

Tabela 5: Tabela de correlação entre as simetrias D_{3h} , D_3 , C_{2v} e C_s .

Grupo de ponto	ν_1	ν_2	ν_3	ν_4
D_{3h}	$A_1'(R)$	$A_2''(IR)$	$E'(R, IR)$	$E'(R, IR)$
D_3	$A_1(R)$	$B_2(IR)$	$E(R, IR)$	$E(R, IR)$
C_{2v}	$A_1(R, IR)$	$B_1(R, IR)$	$A_1(R, IR) + B_2(R, IR)$	$A_1(R, IR) + B_2(R, IR)$
C_s	$A'(R, IR)$	$A''(R, IR)$	$A'(R, IR) + A''(R, IR)$	$A'(R, IR) + A''(R, IR)$

“R” atividade Raman; “IR” atividade no infravermelho.

No espectro Raman mostrado na Figura 15 nota-se uma banda com máximo localizado em 1060 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico, ν_1 , da vibração dos íons carbonato CO_3^{2-} localizados no espaço interlamelar do HDL; tal banda não é observada no espectro FTIR da mesma figura. No Raman também não foi observada a banda em 1390 cm^{-1} que é atribuída ao modo ν_3 do íon carbonato, nem a banda referente ao modo ν_4 que deveria ser observada na região

de 720 cm^{-1} , os quais não são observados devido à sua baixa intensidade evidenciando a baixa quantidade desse íon interlamelar no HDL, que é proveniente de alguma etapa da síntese em que a vedação da atmosfera de N_2 não foi adequada, favorecendo a espécie do íon carbonato quando ocorre a dissolução de $\text{CO}_{2(\text{g})}$ na solução da síntese devido ao pH alcalino (7,5) em que a síntese é conduzida.

Quando o espectro FTIR é analisado com ajuda da deconvolução espectral, Figuras 16 e 17, é possível observar a presença de uma banda em 854 cm^{-1} atribuída à ν_2 , duas bandas na região de 1350 cm^{-1} que seriam atribuídas ao modo ν_3 , localizadas em 1358 e 1400 cm^{-1} , portanto, com um $\Delta = 58\text{ cm}^{-1}$, e duas na região de 720 cm^{-1} , localizadas em 667 e 726 cm^{-1} , que seriam atribuídas ao ν_4 gerando um $\Delta = 59\text{ cm}^{-1}$. Os modos que deveriam apresentar desdobramento caso a simetria fosse diminuída para C_{2v} ou C_s (ν_3 e ν_4) apresentam uma separação de aproximadamente 60 cm^{-1} , um valor muito elevado para um desdobramentos que normalmente são da ordem de 30 a 40 cm^{-1} , portanto, não é possível atribuir tais bandas a desdobramentos causados pela diminuição de simetria e sim provavelmente à interação do íon carbonato em diferentes localizações na matriz, sendo as posições de 1400 e 667 cm^{-1} atribuídas então à interação eletrostática entre o íon carbonato e M-OH , sendo M o alumínio ou zinco, provavelmente com o CO_3^{2-} paralelo à lamela do HDL e, portanto, mantendo sua simetria de D_{3h} . A Figura 18 mostra um esquema de algumas possíveis simetrias que íon carbonato pode atingir.

Figura 18: Esquemas de simetrias, D_{3h} , C_{2v} e C_s , em que o íon carbonato pode ser encontrado. M representa um cátion metálico da matriz.

Para a matriz de HDL de Zn_2AlCl foi feito o XRD que é mostrado na Figura 19.

A análise por XRD da matriz de HDL de Zn_2AlCl mostrou picos de difração característicos para HDL de Zn/Al, sendo os principais e mais intensos localizados em 2θ igual a $11,4^\circ$, $22,9^\circ$, $34,6^\circ$, e $46,2^\circ$ que são atribuídos aos planos basais (003), (006), (012) e (015) respectivamente (Forano, *et al.*, 2006). Utilizando a equação de Bragg ($\lambda_0 = 2d\sin\theta$) é possível estimar o valor do espaço basal utilizando o pico referente ao plano basal (003), desta forma para o Zn_2AlCl temos um espaço basal interlamelar aproximado de $7,7 \text{ \AA}$ coerente com os dados encontrados na literatura tanto para valores experimentais quanto teóricos (Forano, *et al.*, 2006; Lombardo, *et al.*, 2008; Vial, *et al.*, 2008; Zhao, *et al.*, 2010).

Figura 19: Difratoograma de raios X do HDL de Zn_2AlCl .

Além da matriz com zinco e alumínio foi também preparada um matriz de magnésio e alumínio cuja fórmula proposta a partir dos dados de ICP-OES foi $[\text{Mg}_{2,1}\text{Al}(\text{OH})_{6,2}]\text{Cl} \cdot 0,98\text{H}_2\text{O}$.

A caracterização dessa matriz foi feita por XRD, espectroscopia Raman e no infravermelho. Os espectros FT-Raman e FTIR são mostrados na Figura 20.

As bandas encontradas no espectro Raman foram tabeladas e são apresentadas na Tabela 3 com as respectivas atribuições. A análise do espectro Raman mostrado na Figura 20 é semelhante à feita anteriormente para o HDL de zinco, da mesma forma observam-se as bandas localizadas em 556 e 477 cm^{-1} atribuídas a modos de estiramento do tipo Al-O-Al e Mg-O-Al, respectivamente, comparáveis às informações encontradas na literatura (Burrueco, *et al.*, 2013; Palmer, *et al.*, 2008). A atribuição do conjunto de bandas localizadas entre 400 cm^{-1} e 250 cm^{-1} é difícil de ser realizada devido à sua baixa intensidade, porém como citado anteriormente, são atribuídas a deformações angulares de ligações M-O-H, e a banda mais intensa em 153 cm^{-1} é atribuída a deformações angulares O-M-O, sendo M o cátion bivalente ou trivalente (Mora, *et al.*, 2014).

Figura 20: Espectros FT-Raman ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$) e FTIR-ATR do HDL de Mg_2AlCl

Para análise do espectro FTIR foi necessário o tratamento de deconvolução espectral das regiões de 1100 à 400 cm^{-1} e 1750 à 1200 cm^{-1} que são mostrados nas Figuras 21 e 22, respectivamente. As bandas encontradas foram tabeladas junto com suas atribuições e são mostradas na Tabela 4.

Figura 21: Espectro FTIR-ATR do HDL de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ junto com sua deconvolução espectral da região de 1100 a 400 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em vermelho, azul e verde, respectivamente.

Figura 22: Espectro FTIR-ATR do HDL de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ junto com sua deconvolução espectral da região de 1900 a 1100 cm^{-1} . São mostrados o espectro original, o traço ajustado e as bandas ajustadas em vermelho, azul e verde, respectivamente.

Os valores obtidos para bandas ajustadas são comparáveis às citadas por Klopogge, *et al.* (2004), Klopogge, *et al.* (2005) e Frost, *et al.* (2014) para HDL de magnésio e alumínio.

Com a análise dos espectros Raman e FTIR, foi possível verificar a presença da banda localizada em 1062 cm^{-1} na figura, $\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$, no espectro Raman e das bandas em 726, 856 e 1358 cm^{-1} atribuídas, respectivamente, aos modos ν_2 , ν_3 e ν_4 do íon carbonato no espectro FTIR. Tal constatação mostra a presença de íons carbonato na matriz de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ e também que sua simetria não foi diminuída a ponto de chegar em C_{2v} , mantendo-se em D_{3h} ou D_3 já que não foram observados desdobramentos dos modos ν_3 e ν_4 nem atividade do modo ν_1 no FTIR. Tal presença, assim como para a o HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$, deve-se ao método de síntese que foi utilizado para as duas matrizes, que no caso do $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ é realizada em solução fortemente alcalina ($\text{pH} = 9,5$) estabilizando assim a espécie CO_3^{2-} quando o CO_2 atmosférico se solubiliza no meio reacional.

O XRD da matriz de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ também foi feito e é mostrado na Figura 23. Nele é possível observar picos característicos de HDL de Mg/Al sendo os mais intensos encontrados em 2θ igual a $11,4^\circ$, $23,0^\circ$, $34,8^\circ$, $39,2^\circ$ e $46,6^\circ$, atribuídos aos planos basais (003), (006), (012), (015) e (018) respectivamente (Constantino e Pinnavaia, 1995). Utilizando a posição do plano basal (003) na aplicação da fórmula de Bragg, chega-se ao valor de $d = 7,7\text{ \AA}$, similar ao encontrado para matrizes de HDL com cloreto em seu espaço interlamelar (Constantino e Pinnavaia, 1995; Forano, *et al.*, 2006; Lombardo, *et al.*, 2008; Vial, *et al.*, 2008; Zhao, *et al.*, 2010).

Figura 23: Difratoograma de raios X do HDL de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$.

A Figura 24 mostra a comparação entre os espectros Raman das matrizes de HDL de zinco e magnésio.

Figura 24: Espectros FT-Raman de HDL de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ em vermelho e HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ em azul, os traços pontilhados evidenciam o comportamento oposto das duas bandas.

Os traços pontilhados mostrados na Figura 24 evidenciam o deslocamento já observado na literatura (Vieira, *et al.*, 2009), da banda referente ao estiramento M(II)-O-M(III), sendo M(II) o cátion bivalente e M(III) o trivalente, em função do tamanho do raio catiônico. Com o aumento do raio catiônico, há o enfraquecimento da ligação, gerando assim um deslocamento para menores números de onda. Fazendo-se a comparação entre o zinco, que possui raio iônico maior, 74 pm para o Zn^{2+} , e o magnésio de raio iônico menor, 72 pm para o Mg^{2+} (Shannon, 1976), e as respectivas posições com valores de 549 cm^{-1} e 556 cm^{-1} , conclui-se que o fenômeno observado está de acordo com os resultados já reportados por (Vieira, *et al.*, 2009). Como consequência do enfraquecimento das ligações do cátion bivalente com o oxigênio há, portanto, um aumento da força de ligação entre o cátion trivalente (Al^{3+}) e o oxigênio, uma vez que o íon Al^{3+} é um cátion com raio iônico pequeno e de maior carga positiva, deslocando a banda de estiramento localizada em aproximadamente 480 cm^{-1} para maiores números de onda, fato observado e coerente com os dados mostrados nos espectros da Figura 24 que apresentam valores de 478 cm^{-1} para o HDL de magnésio e 490 cm^{-1} para o HDL de zinco.

4.2.2. Caracterização por espectroscopia vibracional e difratometria de raios X das matrizes de HDL com fármaco intercalado ($\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ e $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$)

O HDL de zinco intercalado com sulindaco, $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$, foi previamente caracterizado por ICP-OES pelo grupo do Laboratório de Sólidos Lamelares, assim como as outras matrizes com cloreto intercalado, e a fórmula proposta pelo grupo foi de $[\text{Zn}_{2,0}\text{Al}(\text{OH})_{6,0}](\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{FS})_{0,9}\text{Cl}_{0,1}\cdot 2,2\text{H}_2\text{O}$. A caracterização desse composto feito por espectroscopia no infravermelho, Raman e, posteriormente com XRD. Os espectros FT-Raman de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$, $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ e Sul são apresentados na Figura 25.

Figura 25: Espectros FT-Raman de HDL de zinco e alumínio com cloreto e com sulindaco intercalado no espaço interlamelar, $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ respectivamente, e de sulindaco (Sul).

Nos espectros mostrados nota-se claramente que as bandas da matriz de HDL de zinco não são observadas quando acontece a intercalação, ou seja, o espectro é dominado pela espécie intercalada, fato já evidenciado na literatura para materiais híbridos em que o intercalato apresenta seção de choque maior que a da matriz (de Faria, *et al.*, 1998). O espectro mostrado para o $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ é essencialmente o espectro da espécie desprotonada do Sul, evidenciado pela diminuição e pequeno deslocamento da banda localizada em 1183 cm^{-1} que comparativamente com o espectro experimental e teórico do Sul pode ser atribuída à ausência das deformações angulares do tipo $\delta(\text{C-O-H})$ do grupo carboxila, já que tal grupo funcional estaria desprotonado para que seja possível a ocorrência da interação eletrostática entre o fármaco e a matriz. A banda não se extingue totalmente devido a degenerescência acidental que ocorre na mesma região, tendo na mesma banda contribuições do tipo $\delta(\text{C=C-H})$ e $\delta(\text{C-O-H})$, vide Tabela 1. Os aparecimentos e deslocamentos de algumas bandas na região abaixo de 700 cm^{-1} podem ser

atribuídos a modos de deformação angular que antes não estavam livres e também à extinção dos modos de rede que existiam quando o fármaco estava na forma sólida cristalina. Uma vez que quando intercalado, o fármaco pode ser considerado uma molécula isolada que experimenta um meio eletrostático formado pelas cargas residuais da matriz. Apenas a região espectral abaixo de 1900 cm^{-1} foi mostrada na Figura 25 já que a região de maiores números de onda para os espectros do $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ e Sul são idênticas mostrando apenas estiramentos do tipo C-H, ca. 2900 cm^{-1} , intensos deixando os estiramentos do tipo O-H, c.a. 3300 cm^{-1} , imperceptíveis e que, por sua vez, são observados apenas para o $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$.

Outra importante análise que pode ser feita referente aos espectros da matriz de HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ é que também não é possível observar a banda característica do modo vibracional de estiramento simétrico do íon carbonato intercalado que estaria localizada em 1060 cm^{-1} . Tal observação não exclui a presença deste íon como contaminação, apenas evidencia que o fármaco é a espécie dominante no espectro.

Os espectros FTIR são mostrados na Figura 26 e apresentam as matrizes de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$, de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ e do Sul para fins comparativos.

Pela análise dos espectros FTIR mostrados na Figura 26, nota-se que na matriz de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ é possível observar claramente a banda em 420 cm^{-1} atribuída ao modo de translação do grupo Zn-O-H do HDL. Assim como para os espectros Raman, fica claro que a espécie intercalada do fármaco domina o espectro FTIR, mas tal espécie apresenta um espectro diferente do Sul , evidenciado principalmente pelo desaparecimento da banda mais intensa do Sul em 1697 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C=O do grupo carboxila, e o aparecimento de duas intensas em 1554 e 1376 cm^{-1} no $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ atribuídas aos estiramentos antissimétrico e simétrico do grupo (COO^-) (Minagawa, *et al.*, 2012; Rocha, 2015), tais observações confirmam que a espécie intercalada é a desprotonada, concordando com os resultados obtidos por Raman. A região acima

de 1900 cm^{-1} , que não foi mostrada na Figura 26 devido ao fato das maiores modificações estarem na região de menores números de onda, apresentam essencialmente a somatória da intensa contribuição da banda referente ao estiramento O-H e da contribuição em menor escala das bandas de estiramento C-H, além do desaparecimento da banda atribuída à formação de dímero, c.a. 2750 cm^{-1} , quando o Sul é intercalado.

Figura 26: Espectros FTIR de HDL de zinco e alumínio com cloreto e com sulindaco intercalado no espaço interlamelar, $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ respectivamente, e de sulindaco (Sul).

Para o $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ também foi feito o XRD, que é mostrado na Figura 27. Como observado no $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ os picos do Sul não são observados, mostrando que o fármaco, apesar de presente, não está sua forma cristalina. Além disso, nota-se que os picos mais intensos da matriz de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ são deslocados para menores valores de 2θ quando o Sul é intercalado, evidenciado pela posição dos picos mais intensos 2θ igual a $3,4^\circ$, $6,75^\circ$, $10,1^\circ$ e $13,4^\circ$ atribuídos aos planos basais (003), (006), (009) e (015) respectivamente. Utilizando o valor encontrado para o plano (003), obtém-se uma distância interlamelar, d , de $26,03\text{ \AA}$. Sabendo que a molécula de Sul tem

em seu eixo maior aproximadamente 14 Å de comprimento, supõe-se que no espaço interlamelar existam uma molécula do fármaco interagindo com uma lamela pela interação entre a carga residual positiva da matriz e a carga negativa do grupo carboxilato sendo a molécula orientada com um certo ângulo θ menor do que 45° ao eixo perpendicular a lamela e na lamela adjacente uma segunda molécula do fármaco logo abaixo da primeira interagindo da mesma forma, como mostra o esquema da Figura 28 (Rocha, 2015).

Figura 27: Difratogramas de raios X das matrizes de Zn₂Al.Cl, Zn₂Al.Sul e de Sul comercial.

Figura 28: A) Esquema de intercalação com cloreto entre camadas da matriz de HDL. B) Esquema proposto para a intercalação das moléculas de sulindaco entre camadas da matriz de HDL

As mesmas análises foram feitas para a matriz de magnésio e alumínio com sulindaco intercalado, $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$. Por ICP-OES a fórmula de $[\text{Mg}_{1,9}\text{Al}(\text{OH})_{5,8}](\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{FS})_{0,9}\text{Cl}_{0,1}\cdot 1,4\text{H}_2\text{O}$ foi proposta pelo grupo de pesquisa que o sintetizou. Foram realizadas as análises por espectroscopia no infravermelho, Raman e XDR. Os espectros FT-Raman das matrizes de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$ e do Sul comercial são mostrados na Figura 29.

Figura 29: Espectros FT-Raman de HDL de magnésio e alumínio com cloreto e com sulindaco intercalado no espaço interlamelar, $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ e $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$ respectivamente, e de sulindaco (Sul).

Como mostrado na Figura 29 e previamente comentado para o $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$, não é possível observar as bandas da matriz de magnésio e nem a banda do estiramento simétrico do íon carbonato localizada em 1060 cm^{-1} no $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$. Nota-se também que os espectros FT-Raman do $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$, mostrado na Figura 25, e o do $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$, Figura 29 são essencialmente iguais, apresentando apenas as bandas referentes ao fármaco desprotonado, como mostrado principalmente pela banda localizada em 1183 cm^{-1} . Semelhante à análise do $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$, a região espectral acima de 1900 cm^{-1} não é apresentada, pois não há diferenças entre a posição das bandas de estiramento C-H além de não ser possível a identificação da banda referente ao estiramento O-H da matriz, uma vez que a espécie intercalada domina o espectro por sua seção de choque ser substancialmente maior que a da matriz.

A Figura 30 mostra os espectros FTIR de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$, $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$ e do Sul.

Figura 30: Espectros FTIR de HDL de zinco e alumínio com cloreto e com sulindaco intercalado no espaço interlamelar, $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ respectivamente, e de sulindaco (Sul).

Nota-se que o espectro FTIR do $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$ é muito semelhante ao espectro do $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$, Figura 26, com exceção da região abaixo de 500 cm^{-1} em que o $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$ apresenta um padrão semelhante ao do $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$ com a sobreposição das bandas que seriam do fármaco. É possível identificar duas bandas intensas em 1555 e 1378 cm^{-1} que são atribuídas aos estiramentos antissimétrico e simétrico do grupo carboxilato respectivamente, confirmando a estabilização do fármaco intercalado na sua forma desprotonada que consequentemente interage com as lamelas do HDL.

Os XRD para o $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$ também foram feitos e são mostrados na Figura 31.

Figura 31: Difractogramas de raios X das matrizes de $\text{Mg}_2\text{Al.Cl}$, $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$ e de Sul comercial.

O XRD do $\text{Mg}_2\text{Al.Sul}$, Figura 31, mostra que os picos de difração relacionados ao Sul não são observados, indicando que o fármaco presente não encontra-se na forma cristalina. É nítido também que há o deslocamento para menores valores de 2θ dos picos atribuídos aos planos

basais sendo os principais e mais intensos os picos (003), (006), (009) e (0012), localizados nas posições de 2θ igual a $3,4^\circ$, $6,75^\circ$, $10,1^\circ$ e $13,4^\circ$ respectivamente. Com a posição do pico (003) obtém-se um valor de espaçamento basal de $26,03 \text{ \AA}$, mesmo valor encontrado para o $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$, sugerindo que o modo de interação do fármaco com as lamelas do HDL seja o mesmo já previamente citado para o $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ (Rocha, 2015).

4.3. Análise do processo cicatricial em tecidos musculares por espectroscopia Raman

Quando analisados por espectroscopia Raman tecidos biológicos apresentam heterogeneidades, fazendo-se necessário a obtenção de no mínimo 5 espectros da região de interesse a fim de que se possa trabalhar com espectros médios e assim obter a variância entre os pontos de obtenção dos espectros, mostrando um padrão espectral de maior relevância estatística.

Visando ter uma ampla amostragem dos períodos de reparo tecidual, decidiu-se então obter amostras de estágios críticos do processo, ou seja, estágios representativos em que alterações espectrais representativas do processo de reparo seriam nítidas. Escolheu-se então os períodos de pós-operatório de 7 dias (7PO) em que seria observado ainda um processo inflamatório intenso, 21 dias (21PO) em que o processo de proliferação celular estaria no seu estágio final, 28 dias (28PO) finalizando o primeiro ciclo de reparo e 35 dias (35PO), início do remodelamento fino do tecido conjuntivo recém formado, onde não se esperam grandes diferenças do período de 28PO.

O tipo de trauma causado no tecido muscular é suave e não envolve sangramento, apenas separação do tecido conjuntivo. Esse fato faz com que as alterações nos espectros Raman sejam sutis, implicando na necessidade de tratamento estatístico dos espectros para evidenciar as diferenças de cada período pós-operatório. Outra consequência da pequena variação espectral é que os espectros de referência de proteínas que foram obtidos (mas não foram mostrados nesta

Dissertação, exceto pelos colágenos I e III) não foram eficazes na identificação das espécies bioquímicas presentes nas várias etapas dos processo inflamatório e de reparo dos tecidos.

4.3.1. Análise dos tecidos do grupo controle

Para fins comparativos, espectros do músculo oblíquo externo sadio foram obtidos e considerados como um padrão. O espectro médio do tecido padrão e sua respectiva variância são mostrados na Figura 31.

O espectro Raman médio mostrado na Figura 32 apresenta o padrão espectral característico de tecidos musculares (Pézolet, *et al.*, 1980), nele é nítida que a variância, ainda que significativa, reflete basicamente o mesmo padrão do espectro médio. As atribuições tentativas da bandas Raman são mostradas na Tabela 6.

Figura 32: Espectro padrão de tecido muscular, o traço escuro mostra o espectro médio e a região em cinza mostra a variância entre os espectros obtidos.

Os espectros devem ser analisados como um todo, atentando-se a conjuntos de bandas marcadoras, uma vez que diferentes proteínas podem apresentar, por exemplo, a mesma composição de aminoácidos diferenciando-as na ordem em que tais aminoácidos as compõem e em suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias.

Tabela 6: Atribuições tentativas de bandas encontradas nos espectros Raman de tecidos musculares sadios.

Posição das bandas Raman (cm^{-1})	Atribuição tentativa
1655	Amida I; α -Hélice
1619	$\nu(\text{C}=\text{C})$ de anel de triptofano
1607	$\nu(\text{C}=\text{C})$ de anel de fenilalanina
1587	$\nu(\text{C}=\text{C})$ de fenilalanina e hidroxiprolina
1555	Amida II
1548	Prolina
1460	$\delta(\text{CH}_2)$ e $\delta(\text{CH}_3)$
1450	$\delta(\text{CH}_2)$
1424	$\delta(\text{N-H})$
1398	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1379	$\delta(\text{CH}_3)$
1338	$\delta(\text{C-H})$ + Amida III em colágenos + resíduo de prolina
1319	Amida III
1283	Amida III
1273	Amida III em colágenos
1256	Amida III + bases nitrogenadas de DNA
1248	Amida III em colágenos
1200	$\nu(\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5)$ de triptofano e fenilalanina
1175	$\delta(\text{C-H})$ em citosina e guanina
1159	$\nu(\text{C-N})$ + $\nu(\text{C-C})$ + glicogênio

1126	$\nu(\text{C-N}) + \nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$ de carboidratos
1111	$\delta(\text{C-C}_6\text{H}_5)$ de aminoácidos
1100	$\nu(\text{O-P-O})$ de DNA
1084	Fosfodiésteres de ácidos nucleicos; colágenos; $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$
1076	$\nu(\text{C-C}) + \nu(\text{C-O})$
1063	$\nu(\text{C-C})$ de esqueletos proteicos
1047	Glicogênio
1032	Prolina de colágenos
1003-1005	$\nu(\text{C-C}_6\text{H}_5)_{\text{sim}}$ de fenilalanina
975	$\delta(\text{C-C-H}) + \delta(\text{CH}_3)$
938	Hidroxiprolina de colágenos; $\nu(\text{C-C})$; Glicogênio
923	Prolina
898	$\nu(\text{C-O-C})$ de monossacarídeos
876	$\nu(\text{C-C})$ de hidroxiprolina
854	Prolina
828	Tirosina; $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ de DNA
757	$\delta(\text{C-C}_6\text{H}_5)$ de triptofano e fenilalanina
658	$\nu(\text{C-S})$ de citosina
642	$\delta(\text{C-C})$
526	$\nu(\text{S-S})$

ν = estiramento, δ = deformação angular; Atribuições baseadas em Movassaghi, *et al.* (2007) e Talari, *et al.* (2014).

De modo geral, o que se observa no espectro Raman médio do tecido muscular padrão apresentado na Figura 32 é essencialmente a contribuição de espectros de actina, miosina, Figura 33, que são os principais componentes da constituição dos sarcômeros, que por sua vez, quando em conjunto, formam as fibras musculares maiores, responsáveis pelo movimento muscular (Huard, *et al.*, 2002; Tidball, 2011).

Figura 33: Espectros Raman (785 nm) de referência para actina e miosina, retirados de Zoladek, *et al.* (2010)

Uma vez coletado o padrão espectral do tecido muscular, obtiveram-se os espectros dos tecidos pós-trauma nos diferentes tempos de pós-operatório (7, 21, 28 e 35 dias) que foram obtidos por uma incisão cirúrgica a qual simula um implante intramuscular; tais experimentos foram considerados e nomeados como experimentos controle. Os espectros Raman foram obtidos dos tecidos coletados *post mortem* conservados em solução fisiológica sendo que, os folhetos musculares foram separados para que o laser fosse focalizado diretamente nas regiões que foram afetadas diretamente pela abertura de loja entre as camadas musculares por via cirúrgica. Os espectros Raman médios do grupo controle são mostrados na Figura 34.

Figura 34: Espectros Raman médios obtidos dos tecidos controle em diferentes períodos de pós-operatório. O traço em preto é o espectro médio, a área em cinza representa a variância entre os espectros obtidos e as linhas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.

A partir dos espectros mostrados na Figura 34 junto com as suas respectivas análises estatísticas é possível notar que no espectro referente à amostra de 7PO há uma grande variância significativa entre os espectros obtidos, evidenciado pelo aumento da intensidade da área em cinza, fato atribuído a ser um período crítico de inflamação que apesar de estar em seus estágios finais ainda apresenta uma grande quantidade de proteínas relacionadas ao processo cicatricial que por sua vez podem apresentar uma luminescência intrínseca.

Nota-se também que após 21 dias de pós-operatório, os espectros são muito semelhantes entre si (21PO, 28PO e 35PO) e comparáveis com o espectro padrão, ainda que em 21PO a variância ainda seja grande. Tal resultado é compatível com as informações referentes aos períodos de reparo muscular, que em 21PO a fase proliferativa está terminando, mais ainda assim podendo conter células e proteínas que favorecem essa variância espectral (Beldon, 2010).

Ainda nos espectros mostrados na Figura 34, são evidenciadas pelas linhas tracejadas as regiões onde se observam as maiores variações espectrais nas bandas Raman. Partindo da região de maior número de onda, a primeira linha tracejada encontra-se na região atribuída à banda amida I, banda intensa localizada em aproximadamente 1655 cm^{-1} ; a segunda região localiza-se em aproximadamente 1260 cm^{-1} e é apresentada por bandas intensas e muito largas atribuídas à banda amida III, e ainda nessa mesma região são encontradas bandas de deformação angular do tipo $\delta(\text{C-H})$, que contribuem para o alargamento da região. A posição das bandas atribuídas a amida I ou III é diretamente relacionada a estruturas secundárias de proteínas (Bandekar, 1992; Rousseau, *et al.*, 2004; Talari, *et al.*, 2014; Tuma, 2005; Yu, 1977). A posição das bandas atribuídas a amida I e III para os diferentes períodos de pós-operatório são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: Posições das bandas amida I e III para os diferentes períodos de pós-operatório dos tecidos controle.

Posição / período	Padrão	7PO	21PO	28PO	35PO
Amida I / cm^{-1}	1656	1664	1657	1655	1655
Amida III / cm^{-1}	1265	1256	1260	1263	1264

Analizando os valores encontrados experimentalmente para a banda amida I (Tabela 7), observa-se claramente que há um deslocamento da banda para maior número de onda aos 7PO, de 1656 cm^{-1} para 1664 cm^{-1} , e o retorno da mesma banda à posição original a partir de 21PO. Um comportamento oposto é observado para a amida III, em que há deslocamento de 1265 cm^{-1} do tecido padrão para 1256 cm^{-1} aos 7PO, e seguindo a cronologia a banda retorna à posição de 1264 cm^{-1} .

Como normalmente proteínas podem apresentar diversos tipos de estruturas secundárias em uma só estrutura terciária e quaternária, atribui-se a grande largura e assimetria dessas bandas à combinação de várias possíveis estruturas, como por exemplo, estruturas do tipo α -hélice, folhas- β paralelas e antiparalelas e estruturas desordenadas. Assim, os valores de posição das bandas Raman referentes à banda amida I e III e suas respectivas atribuições a estruturas secundárias encontradas na literatura foram compiladas e são mostradas na Tabela 8

Tabela 8: Valores das posições encontradas na literatura para as bandas amida I e III e suas respectivas atribuições.

	Posição / cm^{-1}	Atribuição
Amida I	1685	Estruturas desordenadas [1,2,5]
	1676	Estruturas desordenadas sem ligação de hidrogênio [2]
	1670	Folhas- β antiparalelas [1,2,3]
	1666	Folhas- β paralelas [2,4]
	1655	α -Hélice [1,2,3]

Amida III	1275	α -Hélice com estruturas desordenadas [2]
	1250-70	α -Hélice [1,2,5]
	1240	Folhas- β em hélices desordenadas [1,2,5]
	1220	Folhas- β [1,2,5]

[1](Talari, *et al.*, 2014), [2] (Movasaghi, *et al.*, 2007), [3] (Pelton e McLean, 2000), [4](Rousseau, *et al.*, 2004), [5] (Yu, 1977)

Comparando-se os valores obtidos experimentalmente com os valores apresentados na Tabela 8, atribui-se o deslocamento citado para as banda amida I e III a um aumento considerável de estruturas secundárias do tipo folhas- β (paralelas ou antiparalelas) na fase final do processo inflamatório, aos 7PO. Tal constatação é compatível com o período, já que ainda podem existir macrófagos que fagocitariam os resquícios de células inviáveis e consequentemente desnaturariam suas proteínas, como por exemplo, actina, miosina e troponina além de todo o tecido conjuntivo que circunda os feixes musculares no caso dos músculos, que antes possuíam grande quantidade de estruturas de α -hélice, podendo torná-las nesse processo em folhas- β ou estruturas desnaturadas.

Além da variação de posição, principalmente da banda amida III, nota-se nessa região de 1400 à 1200 cm^{-1} uma enorme variação de intensidade, mostrando que aos 7PO a intensidade da banda larga localizada em aproximadamente 1260 cm^{-1} eleva-se bastante comparada a outra banda da mesma região em aproximadamente 1330 cm^{-1} , a partir de 21PO a mesma banda em 1260 cm^{-1} vai perdendo intensidade até atingir valores próximos aos do tecido padrão aos 28PO, assemelhando-se à forma obtida para o tecido padrão. Desta forma, sabendo que aos 7PO o processo inflamatório ainda é presente, utiliza-se então essa variação espectral nítida como um marcador de tais processos inflamatórios, uma vez que essa variação espectral não é observada nos demais períodos cicatriciais.

A fim de tentar obter uma melhor distinção entre os períodos de pós-operatório, foi realizado um tratamento estatístico multivariado (PCA, *Principal Component Analysis*) com os espectros do grupo controle. A análise foi conduzida utilizando-se o programa Unscrambler X.10, a partir do conjunto de variáveis obtidas dos espectros Raman. Os pré-tratamentos espectrais utilizados foram padronizados e são citados na descrição da parte experimental. Para o grupo controle foram 6 componentes principais, porém apenas as três primeiras mostraram agrupamentos satisfatórios. Tais componentes apresentaram variância explicada total dos dados de 85, 6 e 4 % para PC-1, PC-2 e PC-3, respectivamente. As demais componentes mostraram variância explicada menor ou igual a 1 % e não mostraram separações satisfatórias. Os gráficos de *scores* de PC-1 por PC-2, PC-1 por PC-3 e PC-2 por PC-3 são mostrados nas Figuras 35, 36 e 37, respectivamente.

Figura 35: Gráficos obtidos por PCA dos *scores* de PC-1 em função de PC-2 para o grupo controle. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.

Figura 36: Gráficos obtidos por PCA dos *scores* de PC-1 em função de PC-3 para o grupo controle. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.

Figura 37: Gráficos obtidos por PCA dos *scores* de PC-2 em função de PC-3 para o grupo controle. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.

Nos três gráficos apresentados observa-se grande separação entre os grupos 7PO e padrão, além do agrupamento dos espectros de 28PO e 35PO, o que mostra que de fato existem grandes diferenças entre o padrão e o 7PO e existe certa semelhança entre os espectros de 28PO e 35PO. O grupo de 21PO, com exceção do gráfico de PC-2 por PC-3, fica isolado de todos os outros grupos, principalmente devido à contribuição no eixo de PC-1.

Para uma melhor compreensão de quais variáveis espectrais (números de onda) promovem o agrupamento e conseqüentemente qual informação química separa os grupos observados pelos scores obtidos do PCA, são mostrados os *loadings* na Figura 38.

De modo geral para o PC-1, com representatividade de 85%, *scores* que apresentam pontuação positiva são influenciados essencialmente por variáveis encontradas acima de 1200 cm^{-1} , o que inclui bandas amida I, II e III. Os *scores* de pontuação negativa são influenciados pela região abaixo de 1200 cm^{-1} , região esta em que são encontradas bandas características de prolina, hidroxiprolina, deformações angulares de ligações do tipo C-H e fosfodiésteres originários de DNA.

Para o PC-2, de representatividade de 6%, *scores* de pontuação positiva mostraram influência das variáveis em 1652 e 1320 cm^{-1} , correlacionadas às bandas amida I e alguma contribuição de bandas amida III, ambas em conformação α -hélice, enquanto que para os valores negativos encontramos variáveis em 1241 e 876 cm^{-1} , características de amida III em conformação de folhas- β em hélices desordenadas e estiramentos $\nu(\text{C-C})$ de hidroxiprolina, respectivamente.

Figura 38: Gráficos de *loadings* das três primeiras componentes principais para os espectros dos tecidos musculares padrão em diferentes períodos de pós-operatório

Para o PC-3, encontra-se apenas atribuição a valores positivos, sendo eles as variáveis encontradas em 1650 e 1266 cm^{-1} que podem ser atribuídas às bandas amida I e III, ambas em

conformação de α -hélice e as variáveis em 936 e 854 cm^{-1} atribuídas bandas de prolina e hidroxiprolina, respectivamente.

Desta forma foi possível diferenciar os períodos de pós-operatório com a análise por espectroscopia Raman e as análises por PCA dos espectros, identificando composições proteicas que se modificaram durante o processo inflamatório, especialmente para o 7PO, mostrando a grande contribuição de estruturas proteicas de forma secundária em folhas- β em hélices desordenadas, enquanto que para os demais períodos há predominância de estruturas do tipo α -Hélice. O período de 21PO mostrou-se similar aos espectros Raman Padrão, 28PO e 35PO, mas pela análise de PCA não se agrupou a nenhum período específico nos gráficos das Figuras 35 e 36, porém, quando se analisou os *scores* de PC-2 por PC-3, o grupo de 21PO se juntou aos conjuntos 28PO e 35PO, mostrando que existem similaridades entre eles, assim como evidenciado pelo espectro Raman médio.

4.4. Análise dos tecidos submetidos a implantes de HDL

Com o intuito de auxiliar a avaliação de biocompatibilidade e biointegração de matrizes de HDL e consequentemente avaliar o reparo tecidual que ocorre no entorno do material implantado, usou-se a espectroscopia Raman.

As cirurgias de implantes foram feitas conforme citado na descrição da parte experimental. A fim de reduzir o número de cobaias, foi utilizado um animal por período e em cada um as pastilhas das matrizes de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ foram implantadas em regiões musculares diferentes junto com a incisão controle. A Figura 39 mostra a foto do músculo oblíquo externo exposto para localização das regiões de implante.

Figura 39: A) Representação esquemática do animal, a linha pontilhada representa o local do corte. B) Localização dos implantes de HDL intramusculares no músculo oblíquo externo. As setas indicam o local dos pontos cirúrgicos. O número 1 é o local em que foi feita a incisão controle, o 2 é o local do implante da matriz Zn_2AlCl e o 3 é o local da de implante da matriz Zn_2AlSul .

As regiões musculares onde foram feitas incisões e implantes são suficientemente bem separada de modo que os processos inflamatórios que ocorrem em cada região não interajam entre si, podendo ser consideradas como regiões isoladas neste modelo estudado.

Após o sacrifício dos animais, as observações macroscópicas das regiões são feitas por análise de transiluminação com luz branca a fim de verificar a extensão do processo de inflamação, evidenciado principalmente pela vermelhidão local, e possíveis incidentes, como por exemplo, a abertura dos pontos cirúrgicos. Nos experimentos realizados não ocorreram incidentes que comprometessem as análises. A Figura 40 mostra dois exemplos de regiões analisadas por transiluminação com luz branca.

Figura 40: Imagens de transiluminação com luz branca das regiões de implante, ambas após 28PO; em A), é mostrada a região com pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$; Em B) é mostrada a região com pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$.

Figura 41: Em A) é mostrada uma imagem de como a amostra chega para análise por espectroscopia Raman; Em B) é mostrada a mesma amostra após a separação dos folhetos musculares entre os quais a pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ foi implantada.

A Figura 41 exemplifica como as amostras de tecido biológico chegam para análise por espectroscopia Raman e como as pastilhas de HDL implantadas ficam alocadas entre os folhetos musculares.

Após o preparo das amostras de tecido submetidos a implante de HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$ e $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ foi observado que no entorno da pastilha, em todos os períodos de pós-operatório e para as duas matrizes de HDL com e sem fármaco, é formada uma camada fina e translúcida de tecido entre o folheto muscular e a pastilha, camada esta que não adere à pastilha. Após a retirada das pastilhas o tecido foi analisado por microscopia Raman da mesma forma como feito para os experimentos do grupo controle.

4.4.1. Análise dos tecidos submetidos a implantes de HDL de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$

Foram obtidos os espectros Raman dos tecidos submetidos a implantes de pastilhas de HDL de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ (HDL-Cl), que são mostrados na Figura 42.

Figura 42: Espectros Raman médios obtidos dos tecidos em contato com a matriz de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ em diferentes períodos de pós-operatório. O traço em preto é o espectro médio, a área em cinza representa a variância entre os espectros obtidos e as linhas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.

A partir da análise dos espectros médios dos tecidos implantados com matriz de HDL de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$, nota-se claramente que a variância é muito grande nos períodos de 7PO e 21PO, final do processo inflamatório e de proliferação, respectivamente, fato já evidenciado para o grupo de experimentos controle. Seguindo as linhas tracejadas mostradas na Figura 42, em ordem decrescente de número de onda, encontra-se primeiramente a região da banda amida I, localizada em torno de 1660 cm^{-1} . Nessa região, assim como já foi evidenciado para o grupo controle, há um deslocamento da posição da banda inicialmente em 1656 cm^{-1} no padrão para 1665 cm^{-1} aos 7PO e retorno desse conjunto de bandas para aproximadamente 1659 cm^{-1} nos demais períodos. Tal comportamento, por evidenciar a presença de diferentes estruturas secundárias das proteínas deve ser refletido também na banda amida III, localizada em aproximadamente em 1260 cm^{-1} . Nessa região são observados deslocamentos partindo de 1265 cm^{-1} , espectros padrão, seguindo para 1257 cm^{-1} aos 7PO e posteriormente para valores próximos de 1260 cm^{-1} . Todos os valores encontrados para as bandas amida I e III são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Posições das bandas Amida I e III para os diferentes períodos de pós-operatório dos tecidos em contato com matriz de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$

Posição / período	Padrão	HDL-CL 7PO	HDL-CL 21PO	HDL-CL 28PO	HDL-CL 35PO
Amida I / cm^{-1}	1656	1665	1659	1659	1660
Amida III / cm^{-1}	1265	1257	1260	1260	1262

Com os valores obtidos (Tabela 9) e comparando-os aos valores mostrados na Tabela 8, pode-se concluir que aos 7PO há a contribuição de estruturas secundárias do tipo folhas- β paralelas ou antiparalelas, sendo essa contribuição diminuída com o passar do tempo, porém não chegando aos valores originais do tecido padrão mesmo após 35 dias de pós-operatório.

Ainda na região da banda amida III, aos 7PO nota-se uma grande elevação da intensidade das bandas que contribuem na região centrada em 1260 cm^{-1} comparadas com a

banda localizada em 1330 cm^{-1} . Após o período inflamatório há uma tendência de diminuição da intensidade das bandas amida III, que tendem a voltar à configuração similar à apresentada para o tecido padrão. Ainda aos 7PO nota-se uma banda intensa e fina em 1247 cm^{-1} atribuída a colágenos, cuja atribuição não é reportada. Concomitantemente há o aparecimento de duas outras bandas localizadas em 921 e 876 cm^{-1} (Movasaghi, *et al.*, 2007; Talari, *et al.*, 2014), atribuídas a prolina e hidroxiprolina, respectivamente. A fim de verificar se a atribuição dessas bandas ao aparecimento de colágenos é coerente, espectros de colágeno do tipo I e III foram obtidos como padrão e são apresentados na Figura 43.

Figura 43: Espectros FT-Raman de colágeno tipo III, em vermelho, e colágeno tipo I, preto.

A estrutura primária de colágenos é composta essencialmente da sequência de aminoácidos do tipo Gly-X-Y que se repete, sendo Gly a glicina, X e Y podem ser diferentes aminoácidos, porém, a sequência de X e Y sendo prolina e hidroxiprolina, respectivamente, é

bastante frequente (Nguyen, *et al.*, 2013; Ricard-Blum, 2011). Segundo Carcamo, *et al.* (2012), Nguyen, *et al.* (2013) e Frushour e Koenig (1975), as bandas localizadas em 921 e 856 cm^{-1} são atribuídas à presença de prolina enquanto que as localizadas em 938 e 875 cm^{-1} à hidroxiprolina, sendo portanto, características de colágenos, fato confirmado pela presença das bandas nos dois padrões de colágeno mostrados na Figura 43.

Nota-se também que no padrão de colágeno tipo III bandas muito intensas e finas são observadas em 1296, 1088 e 1061 cm^{-1} , bandas essas que não são observadas no colágeno tipo I e nem no espectro médio dos tecidos expostos a matriz de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$. Em contrapartida, nota-se que para o colágeno tipo I, a região entre 1350 e 1200 cm^{-1} apresenta uma combinação de bandas localizadas em 1274, 1258 e 1247 cm^{-1} muito mais intensas que as centradas em 1330 cm^{-1} , o que contribui para a sugestão de que aos 7PO, colágeno do tipo I é identificado. Não é possível, entretanto, afirmar a ausência total de colágenos do tipo III, já que existe a possibilidade de sua presença mas em menor quantidade, já que a banda em 1088 cm^{-1} ainda é observada nos demais períodos.

Analizando os demais períodos de pós-operatório, 21PO, 28PO e 35PO, nota-se que a banda em 922 cm^{-1} da prolina ainda é presente, porém a banda característica em 1247 cm^{-1} , característica do colágeno tipo I, não é mais observada, evidenciando uma possível diminuição/transformação de colágenos nesses períodos.

Para verificar a possibilidade distinção estatística entre os períodos, foi feito o PCA utilizando os parâmetros que foram pré-estabelecidos e citados na descrição experimental. Para os tecidos em contato com as pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$, a variância explicada total encontrada foi de 79, 12 e 4% para PC-1, PC-2 e PC-3, respectivamente. Para as demais componentes principais as variâncias encontradas foram menores ou iguais a 1%. Os gráficos de *scores* de PC-1 por PC-2 e

PC-1 por PC-3 são mostrados nas Figuras 44 e 45, respectivamente. O gráfico de PC-2 por PC-3 não é mostrado pois não mostrou separação satisfatória entre os grupos.

Figura 44: Gráficos obtidos por PCA dos *scores* de PC-1 em função de PC-2 para o grupo de tecidos em contato com o HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.

Figura 45: Gráficos obtidos por PCA dos *scores* de PC-1 em função de PC-3 para o grupo de tecidos em contato com o HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Cl}$. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.

Pela análise dos gráficos obtidos por PCA nos dois casos, Figuras 44 e 45, existe uma grande separação entre o padrão e o período de 7PO, e entre eles encontram-se os demais períodos. Para verificar a razão química da separação entre os períodos a análise dos *loadings* obtidos se faz necessária; tais *loadings* são mostrados na Figura 46.

Figura 46: Gráficos de *loadings* das três primeiras componentes principais para os espectros dos tecidos musculares que ficaram em contato com pastilhas de $Zn_2Al_2Cl_4$ em diferentes períodos de pós-operatório

Na primeira componente principal, PC-1, de variância explicada de 76%, a maior contribuição para valores positivos de *scores* é devida à região de variáveis acima de 1200 cm^{-1} . Nota-se que essa região no *loading* do PC-1 a composição de variáveis que são mostradas se correlacionam muito bem, ou seja, muito similar ao padrão espectral do tecido sadio (Padrão) mostrado na Figura 42. A região abaixo de 1200 cm^{-1} contribui significativamente para valores de *scores* negativos em PC-1 e nessa região é que se encontram variáveis que podem ser relacionadas as bandas características de prolina e hidroxiprolina, como por exemplo, as localizadas em 937 e 856 cm^{-1} .

Para o PC-2, de variância explicada de 12%, nota-se que a principal contribuição para valores de *scores* positivos é a região de 1200 a 800 cm^{-1} , região em que são encontrados alguns marcadores como a prolina e hidroxiprolina.

Para a PC-3 que possui variância explicada de 4%, em seus *loadings* pode-se notar que para valores de *scores* positivos há principalmente contribuição da variável em 1659 cm^{-1} atribuída à banda amida I com contribuições de estruturas secundárias em α -hélice e folhas- β . Já para valores de *scores* negativos, há contribuição principalmente da variável em 1379 cm^{-1} .

De modo geral, para os tecidos que tiveram contato com as pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$, os espectros médios mostraram que há similaridade entre os períodos Padrão, 21PO, 28PO e 35PO, sendo o período de 7PO o que apresentou maior disparidade espectral. Pelo PCA, especialmente considerando apenas a PC-1, a grande separação entre Padrão e o 7PO deve-se principalmente às estruturas secundárias das proteínas envolvidas (bandas amida I e III) e como visto na Tabela 9, os demais períodos ficam em posições intermediárias, uma vez que apresentam composição das duas estruturas identificadas, α -hélice e folhas- β . Foram identificados marcadores de colágenos, entre eles a prolina, hidroxiprolina e a banda amida III, principalmente aos 7PO, porém, como

observado pelos espectros médios, tais marcadores tendem a diminuir sua intensidade com o passar do tempo, voltando a serem visíveis aos 35PO. Essa constatação mostra que possivelmente outros processos bioquímicos começam a acontecer aos 28PO, tais processos podem ser devidos à presença da pastilha de HDL e sua lenta dissolução liberando íons Zn^{2+} que, de alguma forma, são aproveitados pelo organismo já que é sabida a existência de metaloproteinases de zinco envolvidas no reparo tecidual relacionadas com a degradação e síntese de componentes da matriz extracelular, dentre eles os colágenos (Galea, *et al.*, 2014).

4.4.2. Análise dos tecidos submetidos a implantes de HDL de $Zn_2Al.Sul$

Foram obtidos os espectros Raman dos tecidos submetidos a implantes de pastilhas de HDL de $Zn_2Al.Sul$ (HDL-Sul), que são mostrados na Figura 47.

Ao analisar os espectros mostrados na Figura 47, nota-se a clara semelhança entre os espectros médios do padrão e 7PO. É possível notar que aos 7PO não são observadas grandes variâncias espectrais como foi mostrado para o grupo de experimentos controle e implantados com HDL-Cl, tal fato não exclui a existência do processo inflamatório neste período, apenas mostra que inflamação foi atenuada, uma vez que o sulindaco intercalado na matriz apresenta propriedades anti-inflamatórias e, portanto, deve estar sendo liberado e atuando nos tecidos adjacentes à pastilha.

Figura 47: Espectros Raman médios obtidos dos tecidos em contato com a matriz de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ em diferentes períodos de pós-operatório. O traço em preto é o espectro médio, a área em cinza representa a variância entre os espectros obtidos e as linhas tracejadas evidenciam as regiões de maiores mudanças espectrais.

Aos 21PO observa-se uma grande variância espectral, apesar do espectro médio ainda se mostrar muito similar ao espectro médio padrão, nota-se com clareza a presença de uma banda larga de intensidade relativa baixa em 1088 cm^{-1} . Tal banda encontra-se em uma região em que modos vibracionais provenientes de moléculas orgânicas como, por exemplo, de aminoácidos e carboidratos podem se sobrepor a modos vibracionais de moléculas inorgânicas como fosfatos, encontrados em DNA e RNA, fosfolipídios das bicamadas das membranas celulares e da moléculas de adenosina trifosfato (ATP) que fornecem energia para processos bioquímicos, além de também ser uma região em que pode aparecer o modo vibracional ν_1 do íon carbonato (CO_3^{2-}) decorrente do CO_2 formado nas vias metabólicas celulares, tornando a atribuição desta banda ou conjunto de bandas ainda duvidosa.

A partir dos 28PO os espectros médios começam a apresentar uma intensificação das bandas largas centradas em aproximadamente 1260 cm^{-1} , atribuídas à banda amida III, além do aparecimento das bandas em 922 e 874 cm^{-1} que, como citado anteriormente, são atribuídas a prolina e hidroxiprolina respectivamente, o que pode evidenciar a formação de colágenos nesse tecido recém formado no entorno da pastilha implantada. Também nota-se que a variância espectral torna-se maior, comparada à observada aos 7PO, o que pode evidenciar novos processos bioquímicos induzidos pela presença do fármaco.

Em relação à análise da banda amida I, nota-se que há um deslocamento partindo de 1656 cm^{-1} para o padrão indo para valores de número de onda maiores, atingindo seu máximo aos 28PO com valor de 1662 cm^{-1} , retrocedendo para 1660 cm^{-1} aos 35PO. A fim de se relacionar esse deslocamento com a estrutura secundária de proteínas envolvidas, a posição média da banda centrada em aproximadamente em 1260 cm^{-1} atribuída à banda amida III também foi mensurada e

mostra um comportamento inverso ao observado para amida I. Os valores para as duas bandas são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Posições das bandas Amida I e III para os diferentes períodos de pós-operatório dos tecidos em contato com matriz de Zn₂Al.Sul.

Posição / período	Padrão	HDL-Sul 7PO	HDL-Sul 21PO	HDL-Sul 28PO	HDL-Sul 35PO
Amida I / cm⁻¹	1656	1657	1659	1662	1660
Amida III / cm⁻¹	1265	1260	1259	1257	1260

Os valores de posição das bandas Amida I atingem um máximo, 1662 cm⁻¹, aos 28PO, mesmo período em que a banda Amida III atinge seu mínimo, 1257 cm⁻¹. Comparando com os valores compilados da literatura mostrados na Tabela 8 e sabendo que essas regiões são formadas pela composição de bandas que refletem as estruturas secundárias das proteínas, pode-se inferir que inicialmente existia uma majoritária contribuição de estruturas do tipo α -hélice e com os pequenos deslocamentos observados tanto para banda amida I quanto para banda amida III, estruturas do tipo folhas- β começam a influenciar a posição média, formando uma composição mista com estruturas do tipo folhas- β em menor quantidade.

Foi observado também o surgimento de bandas localizadas em 1634 e 1591 cm⁻¹ a partir de 28PO, sendo intensificadas aos 35PO. A banda em 1634 cm⁻¹ é encontrada no espectro do colágeno tipo III utilizado como padrão, enquanto a banda em 1591 cm⁻¹ é encontrada apenas no espectro do colágeno tipo I; Aliando essas informações com a intensificação das bandas localizadas em 922 e 847 cm⁻¹ atribuídas a prolina e hidroxiprolina, respectivamente, conclui-se que aos 35PO há um aumento da quantidade de colágenos sendo possível, através dessas bandas marcadoras, diferenciar os presentes em maior quantidade entre colágenos do tipo I e III.

Foi feito o PCA dos espectros obtidos dos tecidos em contato com a matriz de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ e neles foram utilizado os parâmetros que foram pré-estabelecidos e citados na descrição experimental. A variância total explicada para as componentes PC-1, PC-2 e PC-3 foram de 79, 10 e 3% respectivamente, as demais componentes não foram utilizadas, pois não mostraram separação entre os grupos (*scores*) e nem resolução (*loadings*) suficiente para que informações químicas pudessem ser obtidas. Os gráficos de *scores* de PC-1 por PC-2 e PC-1 por PC-3 são mostrados nas Figuras 48 e 49, respectivamente.

Figura 48: Gráficos obtidos por PCA dos *scores* de PC-1 em função de PC-2 para o grupo de tecidos em contato com o HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.

Figura 49: Gráficos obtidos por PCA dos scores de PC-1 em função de PC-3 para o grupo de tecidos em contato com o HDL de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$. As elipses foram colocadas de modo não estatístico para melhor localizar a separação entre os períodos.

Para que se obtenham as informações químicas que expliquem as separações e agrupamentos mostrados nos scores obtidos para essas amostras, os *loadings* são mostrados na Figura 50.

Figura 50: Gráficos de *loadings* das três primeiras componentes principais para os espectros dos tecidos musculares que ficaram em contato com pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{S}_4$ em diferentes períodos de pós-operatório.

O gráfico que mostra a distribuição dos *scores* de PC-1 por PC-2, Figura 48, em relação a PC-1 apresenta uma grande separação entre dois conjuntos. O primeiro contendo o Padrão, 7PO e 21PO com valores de *scores* positivos que possuem contribuição de variáveis acima de 1200 cm^{-1} , principalmente com grande influência das variáveis localizadas em 1655 e 1332 cm^{-1} , que por sua vez podem ser relacionadas às bandas amida I e algum resquício de bandas amida III, respectivamente, ambas em conformação α -hélice, o que concorda com os espectros médios para esses períodos, já que de fato esses períodos são muito similares entre si. O segundo grande grupo que é separado para valores de *scores* negativos em relação a PC-1 e possui influência das variáveis abaixo de 1200 cm^{-1} e é composto por 28PO e 35PO.

Os *loadings* da PC-2 mostram claramente uma influência das variáveis em 1658 , 932 e 852 cm^{-1} em valores positivos que, correlacionadas às informações químicas, são atribuídas às bandas amida I em α -hélice com alguma contribuição de estruturas secundárias do tipo folhas- β , prolina e hidroxiprolina, respectivamente. Tais variáveis fazem com que os conjuntos Padrão, 21PO, 28PO e 35PO tenham valores de *scores* positivos. O período de 7PO é o que possui influência das variáveis negativas nos *loadings*, tornando assim o valor dos *scores* negativos, sendo a variável encontrada em 1362 cm^{-1} o motivo da separação de tal grupo.

Com a análise do gráfico de *scores* de PC-1 por PC-3, Figura 49, é possível notar mais claramente a separação feita pela PC-1 nos dois agrupamentos já citados, uma vez que a PC-3 influencia muito pouco no conjunto Padrão, 7PO e 21PO. A PC-3 separa apenas os períodos 28PO de 35PO, isso porque em seus *loadings* há a contribuição das variáveis positivas em 1660 e 1633 cm^{-1} , que quando correlacionadas às bandas encontradas nos espectros médios, observa-se que especialmente a banda em 1633 cm^{-1} é mais proeminente aos 35PO.

Desta forma, como conclusão prévia, as amostras em contato com a matriz de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{S}_4$, sofreram de um processo inflamatório mais brando, provavelmente por conta da presença do fármaco anti-inflamatório, nota-se também que há uma intensificação de bandas que são atribuídas a colágenos.

4.5. Análise histomorfológica dos tecidos

Concomitantemente às análises por espectroscopia Raman, foram feitas também as análises histomorfológicas das mesmas amostras, que foram divididas seguindo metade ao Laboratório de Espectroscopia Molecular para as devidas medidas vibracionais e a outra metade submetida aos processos de fixação em resina e coloração com as técnicas de hematoxilina e eosina (HE) e *Picrosirius Red* (Picro). Todos os procedimentos seguidos foram citados no capítulo referente à parte experimental e foram feitos pelo aluno Rodrigo Barbosa doutorando do programa de pós-graduação da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP sob orientação do Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh.

Análises histomorfológicas utilizando técnicas de coloração por HE e Picro são técnicas de rotina na clínica médica e necessitam que seja feita biópsia (remoção de tecido do indivíduo), além de levar um tempo relativamente longo, cerca de 3 dias, para que seja possível obter as imagens das lâminas. No HE são corados os núcleos celulares e a parte proteica do citoplasma das células em cores distintas, permitindo assim, na microscopia ótica, a identificação do crescimento ou degradação celular, além da diferenciação das células pelo seu formato. Já o Picro é baseado na birrefringência do tecido corado frente à luz polarizada, diferenciando assim principalmente fibras de colágeno do tipo I, altamente birrefringentes e de coloração

avermelhada, das fibras colágenas do tipo III que também são birrefringentes e apresentam coloração esverdeada.

As fotomicrografias dos cortes transversais dos tecidos submetidos ao experimento controle e corados pela técnica HE são mostradas na Figura 51.

Figura 51: Fotomicrografias dos tecidos controle nos períodos de 7PO, 21PO, 28PO e 35PO, com aumento de 20x. Coloração por HE.

Na histologia do grupo controle (Figura 51) é possível observar aos 7PO uma grande quantidade de células que formam a matriz extracelular, MEC, que se localiza entre as camadas de fibras musculares (células grandes com núcleo periférico) e o tecido adiposo (vacâncias brancas). Esse conjunto de células encontradas na MEC apresentam núcleos (coloração azulada) em formato fusiformes e de bastonetes, que podem ser atribuídos a fibrócitos ou fibroblastos, que por sua vez são compatíveis com o período de 7 dias, já que o processo inflamatório está em seus

estágios terminais, visto que tal reparação foi motivada por um trauma brando que apenas separou as camadas musculares. Aos 21PO, nota-se a diminuição de células no tecido conjuntivo e o que parece ser a formação e fibras alongadas. A amostra de 28PO mostrou a presença de vasos sanguíneos, região de cor avermelhada intensa, circundados pela MEC que podem ter se formado na região afetada. Aos 35 PO observa-se uma grande concentração de camada adiposa circundada por fibras alongadas da MEC.

A técnica Picro foi utilizada nas mesmas lâminas a fim de permitir identificação do tipo de fibra que está se formando na MEC e as fotomicrografias são mostradas na Figura 52.

Figura 52: Fotomicrografias dos tecidos controle nos períodos de 21PO, 28PO e 35PO. A região em vermelho indica a presença de colágeno do tipo I (seta branca continua) e a região em verde indica ser do tipo III (seta branca descontinua). Aumento 20x com técnica Picro de coloração.

As fibras da MEC que eram observadas nas lâminas por HE, com a técnica Picro (Figura 51) ficam evidentes serem fibras de colágeno do tipo I e III, sendo fibras de colágeno tipo I de coloração avermelhada e o tipo III esverdeada. Aos 21PO nota-se uma composição heterogênea de colágenos tipos I e III, com a presença de ilhas de colágenos I. Aos 28PO a heterogeneidade da composição colágena também é possível de ser vista, apesar da baixa nitidez. Fica claro também que aos 35PO há uma predominância das fibras colágenas do tipo I. Colágeno do tipo I é frequentemente encontrado em cartilagens fibrosas e tendões por possuir características mecânicas mais rígidas do que o colágeno tipo III, que por sua vez é mais elástico e encontrado com mais frequência, por exemplo, na MEC de tecidos musculares, fatos esses que mostram que o tecido afetado tende a formar uma cicatriz mais rígida com a presença de uma matriz colágena tipo I (Ricard-Blum, 2011). As fotomicrografias da lâmina de 7PO não forneceram nitidez suficiente e por isso não são mostradas.

Assim como feito para o grupo controle, as análises histomorfológicas foram feitas também para os tecidos implantados com matriz de Zn_2AlCl . As fotomicrografias dos cortes transversais corados por HE são mostradas na Figura 53.

Figura 53: Fotomicrografia dos tecidos implantados com matriz de Zn_2Al_2Cl nos períodos de 7PO, 21PO, 28PO e 35PO, com aumento de 20x. As barras pretas são para evidenciar a variação da espessura do tecido conjuntivo que envolve a pastilha implantada. Coloração por HE.

Como observado na Figura 53, aos 7PO encontra-se uma camada celular de aproximadamente 250 µm com a presença de muitos núcleos celulares, possivelmente devidos à presença de leucócitos, o que evidencia uma reação inflamatória intensa nesse período. Já aos 21PO a quantidade de núcleos celulares diminui consideravelmente e os núcleos presentes já possuem formas fusiformes, que podem ser atribuídos a fibrócitos e fibroblastos. Nota-se também que a espessura da camada de tecido conjuntivo diminui para cerca de 180 µm e tal camada começa a apresentar tecido fibroso entre a pastilha e as células musculares, e que é evidenciado pelas ondulações observadas. As amostras de 28PO e 35PO mostraram camada de tecido conjuntivo de aproximadamente 125 µm e nelas já é possível notar uma maior organização das fibras nessa MEC. Não foi observada uma ação inflamatória prolongada, o que evidencia que a

matriz de HDL foi bem aceita pelo tecido, confirmando a biocompatibilidade dessa classe de matrizes de zinco e alumínio.

Para identificação da composição do tecido fibroso encontrado, as lamínas foram submetidas à técnica Picro de coloração e suas fotomicrografias são mostradas na Figura 54.

Figura 54: Fotomicrografias dos tecidos implantados com Zn_2AlCl nos períodos de 21PO, 28PO e 35PO. A região em vermelho indica a presença de colágeno do tipo I (seta branca contínua) e a região em verde indica ser do tipo III (seta branca descontinua). Aumento 20x com técnica Picro de coloração.

Nas histologias mostradas na Figura 54 coradas por Picro é possível observar a formação de fibras com as duas colorações aos 21PO, mostrando ainda a heterogeneidade da composição de colágenos neste período. Aos 28 PO notam-se mais fibras de coloração esverdeada com fraca intensidade, mas ainda assim é possível verificar que a partir desse período há uma predominância de pequenas fibras de colágeno tipo III. A lâmina com tecido de 35PO mostra claramente a predominância das fibras esverdeadas de colágeno tipo III, mas também apresenta

alguns agregados avermelhados de colágeno tipo I. De modo geral, a presença majoritária de colágenos do tipo I demonstra que o tecido tende a voltar a seu estado fisiológico natural mesmo com a presença do que seria um “corpo estranho” ou antígeno, demonstrando assim a grande aceitação do HDL de zinco e alumínio pelo organismo.

Foram feitas também as análises histomorfológicas dos tecidos submetidos a implantes com matriz de $Zn_2Al.Sul$. As fotomicrografias dos cortes corados por HE são mostradas na Figura 55.

Figura 55: Fotomicrografia dos tecidos implantados com matriz de $Zn_2Al.Sul$ nos períodos de 7PO, 21PO, 28PO e 35PO, com aumento de 20x. As barras pretas são para evidenciar a variação da espessura do tecido conjuntivo que envolve a pastilha implantada, e a seta branca evidencia a formação de neovascularização e a seta preta evidencia a localização de uma invaginação de tecido dentro da pastilha. Coloração por HE.

Pelas imagens histológicas mostradas na Figura 55 é possível notar que aos 7PO a camada celular localizada entre a pastilha e as fibras musculares é muito espessa, com cerca de 350 μm , e apresenta muitos núcleos celulares que provavelmente são células de defesa juntamente com o início da formação de fibrócitos e fibroblastos, o que evidencia ainda um processo inflamatório mais ameno quando se compara a quantidade de núcleos no tecido submetido ao implante da matriz de Zn_2AlCl mostrado na Figura 53. Ainda aos 7PO é possível observar agregados de pontos avermelhados que indicam a formação de neovascularização do tecido.

Aos 21PO nota-se que a camada de tecido conjuntivo se retrai e fica com espessura de aproximadamente 130 μm e nela são encontrados núcleos celulares fusiformes, atribuídos a fibroblastos e fibrócitos, e o início de uma formação fibrilar ainda desorganizada. É possível notar também a presença de um grande agregado de pontos avermelhados, mostrando que houve a formação de vasos sanguíneos na região.

A lâmina referente aos 28PO mostra ainda mais retração da camada de tecido conjuntivo para aproximadamente 100 μm e nela apenas são encontrados núcleos celulares fusiformes atribuídos à presença de fibrócitos e fibroblastos, além da presença de tecido fibroso completamente orientado. Nota-se também uma grande invaginação de tecido conjuntivo para dentro da pastilha, confirmando assim a não antigenicidade da matriz de HDL.

O corte que foi realizado no tecido de 35PO não foi um corte transversal devido a dificuldade de manter a pastilha imóvel na hora da coleta do tecido, portanto, a distancia entre a camada muscular e a pastilha é uma distancia aparente. Ainda assim, nesta imagem é possível evidenciar a grande presença de micro vasos sanguíneos e a grande organização de tecido fibroso que é encontrado na camada celular entre a pastilha e a base muscular.

Para identificação da composição do tecido fibroso encontrado, as âminas foram submetidas à técnica Picro de coloração e suas fotomicrografias são mostradas na Figura 56.

Figura 56: Fotomicrografias dos tecidos implantados com $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ nos períodos de 21PO, 28PO e 35PO. A região em vermelho indica a presença de colágeno do tipo I (seta branca contínua) e a região em verde indica ser do tipo III (seta branca descontinua). A seta preta evidencia uma invaginação de tecido na pastilha. Aumento 20x com técnica Picro de coloração.

Nas histologias mostradas na Figura 56 coradas por Picro é possível observar aos 21PO que a camada de tecido conjuntivo apresenta fibras muito tênues na coloração esverdeada, o que indica presença de colágeno tipo III. Já aos 28PO a camada de tecido conjuntivo apresenta fibras esverdeadas um pouco mais definidas, mas também apresenta algumas fibras alongadas de coloração avermelhada, o que indica colágenos do tipo I. Ainda aos 28PO, onde foi identificada a invaginação de tecidos na pastilha, é possível notar que dentro da pastilha há o crescimento de fibras de colágeno tipo III como consequência do crescimento celular.

Ainda que a lâmina de 35PO não esteja cortada na transversal, é possível observar nela a predominância de fibras esverdeadas de colágeno tipo III, mas com a presença de regiões com fibras avermelhadas de colágeno tipo I, o que evidencia o retorno do tecido a sua composição natural.

Todas as observações indicam que o sulindaco, ainda que sendo uma pró-droga que deveria ser previamente metabolizada à sua forma reduzida para ter uma ação anti-inflamatória, apresentou tal ação anti-inflamatória local uma vez que já aos 7PO os tecidos mostram um processo inflamatório muito menor comparado com o HDL de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ e o grupo controle. O mecanismo de ação local do fármaco não é conhecido, mas tal constatação de ação local do sulindaco merece considerável atenção para estudos futuros. Outra constatação é que o contato do tecido com a matriz de HDL de zinco e alumínio induz o grande crescimento de fibras colágenas do tipo III, fato este que pode vir a ser de grande utilidade na área médica já que além de carregador de possíveis fármacos que podem ser liberados localmente, essa matriz inorgânica também pode ser usada quando cicatrizes formadas por colágeno tipo I sejam indesejadas.

4.6. Análise das pastilhas implantadas de HDL por espectroscopia Raman

Além da análise por espectroscopia Raman dos tecidos, foi feita também a análise das pastilhas de HDL implantadas, uma vez que foi visto pelas histomorfologias que ocorrem invaginações de tecido conjuntivo nas pastilhas implantadas. Além disso, verificou-se que de alguma forma o sulindaco intercalado teve ação anti-inflamatória local, o que evidencia que ele deve ter sido liberado localmente. Através da espectroscopia Raman seria possível confirmar tais constatações pela análise das pastilhas.

4.6.1. Análise das pastilhas implantadas de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ por espectroscopia Raman

Os espectros FT-Raman das pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ implantadas foram obtidos e são mostrados nas Figuras 57 e 58 que evidenciam as regiões de estiramento C-H e de bandas características da matriz, respectivamente.

Figura 57: Espectros FT-Raman da região de 3500 a 2650 cm^{-1} da pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ padrão e as removidas aos 7PO, 21PO, 28PO e 35PO após os implantes.

Analisando a região entre 3500 e 2650 cm^{-1} , Figura 56, nota-se claramente que a pastilha considerada como padrão possui apenas uma composição de bandas localizadas em aproximadamente 3300 cm^{-1} a que foram previamente atribuídas a estiramentos do tipo $\nu(\text{O-H})$ presentes na estrutura da matriz e de moléculas de água que estariam presentes na região interlamelar. Tal composição de bandas se mantém nos demais períodos. Já aos 7PO é nítida a presença das bandas localizadas em 2995 e 2940 cm^{-1} que são atribuídas a estiramentos do tipo $\nu(\text{C-H})_{\text{antissimétrico}}$ e $\nu(\text{C-H})_{\text{simétrico}}$, respectivamente. Como na composição da matriz padrão não há

matéria orgânica, tais bandas só podem ser devido a matéria orgânica que foi adsorvida à superfície da pastilha, ou pelas possíveis invaginações de tecido que foram evidenciadas pelas análises histomorfológica. Bandas características de resquícios orgânicos não foram observadas em outras regiões do espectro, mostrando que apesar de presente, tal matéria orgânica está em baixa quantidade uma vez que a resposta do equipamento FT-Raman utilizado tende a ser linear em relação à concentração de espalhadores Raman. Desta forma apenas é confirmada a presença de matéria orgânica nas pastilhas implantadas, mas a identificação das moléculas envolvidas não foi possível. Sugere-se então, baseado também nas histomorfologias, que tal resquício orgânico seria proveniente do tecido conjuntivo que se forma no entorno da pastilha.

A Figura 58 mostra os espectros FT-Raman de 1300 a 400 cm^{-1} das pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ implantadas.

Figura 58: Espectros FT-Raman da região de 1300 a 400 cm^{-1} da pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}_4$ padrão e as removidas aos 7PO, 21PO, 28PO e 35PO após os implantes.

Na Figura 58 é possível notar que a bandas localizada em 1060 cm^{-1} , atribuída ao estiramento ν_1 do íon carbonato, aumenta muito sua intensidade em relação a banda da matriz, 552 cm^{-1} , evidenciando o aumento da quantidade de íons carbonato que estão adsorvidos à superfície do HDL ou em seu espaço interlamelar.

A Tabela 11 mostra os valores de intensidade obtidos para as duas bandas citadas e a razão que foi obtida entre tais intensidades.

Tabela 11: Valores de intensidade das bandas em 552 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} e os valores obtidos pela razão entre as suas intensidades nos diferentes períodos de pós-operatório.

	$I_{(552)}$	$I_{(1060)}$	$I_{(1060)}/I_{(552)}$
Padrão	0,0316	0,0118	0,375
7 PO	0,0368	0,0276	0,75
21 PO	0,355	0,0423	1,19
28 PO	0,0327	0,0386	1,18
35 PO	0,0320	0,0359	1,12

Nota-se a partir dos valores de intensidades da banda em 552 cm^{-1} , mostrados na Tabela 11, que apesar de mostrarem variação entre si, são valores próximos, o que é compatível com o procedimento de pastilhamento das matrizes em que foi utilizada uma massa aproximada de 21,4 mg de HDL em cada pastilha.

Quando feita a razão entre as intensidades da banda em 1060 cm^{-1} do íon carbonato e a banda em 552 cm^{-1} da matriz de $\text{Zn}_2\text{Al}_2\text{Cl}$ nota-se que inicialmente, no padrão, tal razão fornece um valor de 0,375 entre as bandas. Já aos 7PO tal razão já fornece um valor de aproximadamente 0,75 e a partir dos 21PO o valor da razão se mantém praticamente constante em

aproximadamente 1,18, mostrando que houve uma saturação do HDL por íon carbonato. Sugere-se que houve uma troca iônica do cloreto pelo íon carbonato, que por ter carga negativa maior que a carga do íon cloreto, tende interagir de maneira mais forte à carga residual positiva da matriz. A origem destes íons carbonato ainda é incerta, mas uma das possibilidades é que eles tenham sido originados a partir do CO_2 liberado do processo metabólico celular intenso durante a inflamação, solubilizado e estabilizado na forma de íon CO_3^{2-} quando na interface da matriz de HDL que é composta por espécies, por exemplo, grupos OH^- que deixariam o ambiente ao seu redor com valores de pH acima de 7, ou seja, básico.

4.6.2. Análise das pastilhas implantadas de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ por espectroscopia Raman

As análises por espectroscopia Raman das pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ também foram feitas, porém, o fármaco possui muitas bandas na região de estiramentos C-H, além do fato de que o espectro do fármaco domina e se sobrepõe a todas as bandas da matriz e de suas possíveis impurezas como o íon carbonato, não permitiu que se fizesse a identificação de possíveis tecidos conjuntivos adsorvidos ou invaginados à pastilha.

Os espectros FT-Raman das pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ implantadas e da pastilha padrão são mostrados na Figura 59 e evidenciam a região que apresenta as duas bandas mais intensas do sulindaco intercalado.

Figura 59: Espectros FT-Raman da região de 1660 a 1540 cm^{-1} da pastilha de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ padrão e as removidas aos 7PO, 21PO, 28PO e 35PO após os implantes.

Apesar da impossibilidade de se verificar a presença de outras matérias orgânicas na pastilha além do fármaco, foi nítida a diminuição da intensidade de todas as bandas da espécie desprotonada da droga com a evolução temporal, o que evidencia, portanto, a diminuição da concentração do fármaco na pastilha.

A Tabela 12 mostra os valores das intensidades da banda mais intensa do sulindaco, 1621 cm^{-1} , encontradas nas pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ implantadas e a comparação, em porcentagem, com a pastilha considerada padrão.

Tabela 12: Valores de intensidade da banda do sulindaco, localizada em 1621 cm^{-1} , das pastilhas implantadas e suas respectivas porcentagens em relação à intensidade da mesma banda da pastilha padrão.

	$I_{(1621)}$	Porcentagem em relação ao padrão/ (%)
Padrão	1,457	100,0
7 PO	1,355	92,8
21 PO	0,982	67,4
28 PO	0,832	57,1
35 PO	0,808	55,4

A massa média das pastilhas de $\text{Zn}_2\text{Al.Sul}$ foi de 41,4 mg, portanto, pequenas flutuações no valor das massas já são esperadas devido a possíveis erros de medida durante o pastilhamento. Tais erros influenciam diretamente na variação da intensidade Raman das bandas já que o sinal Raman é proporcional ao número de espalhadores contidos na amostra, portanto, de modo geral em uma variação pequena na massa, variações pequenas de intensidade Raman são esperadas, mas na Tabela 12 observa-se que a banda em 1621 cm^{-1} perde praticamente metade da sua intensidade aos 28 dias, o que evidencia que houve a liberação do fármaco no tecido e não uma variação por erros de medida. A quantificação do fármaco que foi liberado utilizando a espectroscopia Raman foi feita levando em conta a resposta linear do equipamento FT-Raman utilizado frente a concentração de espalhadores Raman, desta forma, sugere-se que aproximadamente metade do fármaco presente inicialmente na pastilha tenha sido liberado aos 35PO.

5. Conclusões

Através do estudo aqui reportado foi possível aprimorar a atribuição vibracional para o sulindaco em relação à encontrada na literatura, sustentando-a por cálculos DFT realizados. A caracterização do produto comercial utilizado na preparação de intercalatos com HDL confirmou a presença do estereoisômero Z em sua forma polimórfica do tipo II.

Também foi possível melhorar a atribuição vibracional dos HDLs de magnésio e zinco na região de baixa frequência, especialmente no caso da espectroscopia Raman, associando as bandas 556 e 549 cm^{-1} a vibrações de estiramento $\nu(\text{M}^{\text{II}}\text{-O-Al})$ quando M^{II} é magnésio ou zinco, respectivamente. Além disso, a simetria do íon carbonato intercalado (e consequentemente o modo como ele interage com a matriz), pode ser determinada a partir de comparações dos espectros Raman e no infravermelho.

Na análise dos HDLs intercalados com sulindaco, os espectros Raman e de absorção no IR mostraram que a molécula de sulindaco desprotonado não sofre alterações estruturais apreciáveis quando intercalada. As análises de XRD confirmam a intercalação do fármaco nas matrizes estudadas, mostrando expressiva expansão do espaço interlamelar. Um estudo comparativo de intensidades relativas das bandas dos espectros Raman de pastilhas de intercalatos de HDL com Sul, mostra a progressiva incorporação de carbonato no espaço interlamelar e a liberação do fármaco para o tecido muscular no qual a pastilha se encontra.

Em relação à análise por espectroscopia Raman dos tecidos musculares do grupo controle, foi possível acompanhar o processo inflamatório principalmente devido à grande diferença espectral entre o estágio de inflamação aguda (7PO) dos demais períodos. Tais constatações foram compatíveis com os resultados obtidos por análise histomorfológica.

Tecidos implantados com HDL-Cl comparados com os tecidos do grupo controle mostram que a presença da matriz não afetou significativamente o processo inflamatório, o que confirma a alta biocompatibilidade do material. Esse fato também foi confirmado pelas análises histomorfológicas que evidenciaram a diminuição da camada de tecido conjuntivo entre as fibras musculares e a pastilha, além da formação de colágeno tipo III que, apesar de não ter sido discriminado nos espectros Raman foi indiscutivelmente mostrado por Picro. A formação das fibras de colágeno possivelmente foi induzida pela presença da matriz, especificamente de seus íons Zn^{2+} , já que a produção de colágenos por metaloproteinases é dependente desse metal.

Como as pastilhas de HDL-Cl implantadas são grandes sorvedoras de íons carbonato, isso pode ter influência direta no pH do meio tecidual afetando o processo inflamatório, que de certa forma foi atenuado.

Os tecidos implantados com HDL-Sul mostraram tanto por espectroscopia Raman, quanto por análises histológicas que a resposta inflamatória é muito diminuída e as evidências máximas disso foram a formação de invaginações teciduais na pastilha e a formação de neovascularização suas áreas adjacentes. Tais constatações levam à conclusão de que houve a liberação e ação local do fármaco. A liberação do fármaco também foi confirmada pela análise espectroscópica das pastilhas implantadas.

Os pontos altos do uso da microscopia Raman no tipo de investigação aqui relatada são (i) a possibilidade de estudar diretamente o tecido, sem necessidade de qualquer tipo de tratamento, exceto a exposição da área de interesse ao feixe de radiação laser e sem que a presença de água interfira; (ii) o fato de não serem necessários corantes ou outras substâncias extrínsecas para a extração das informações desejadas; (iii) a possibilidade de investigar simultaneamente tanto as pastilhas de HDL (fase inorgânica) quando os tecidos; (iv) o tempo para conclusão das análises, que são feitas diretamente nos tecidos, sem necessidade de

preparação de lâminas; (v) maior especificidade química, porque nas análises histomorfológicas a técnica de coramento implica na escolha prévia das espécies a serem identificadas e quanto mais completa for essa identificação, mais lâminas devem ser preparadas para que diferentes corantes possam ser empregados e (vi) a possibilidade de quantificação de determinadas espécies (como no caso dos íons carbonato reportado nesta Dissertação), quando existirem outras bandas que possam ser usadas como padrão interno.

Os resultados reportados nesta Dissertação mostraram a eficiência da microscopia Raman não apenas como ferramenta de diagnóstico clínico, substituindo com vantagens em termos de especificidade e tempo as análises histomorfológicas convencionais, mas também como instrumento em investigações de respostas bioquímica de tecidos a perturbações externas. Em ambos os casos há, certamente um campo vasto de investigações ainda por serem exploradas.

6. Perspectivas futuras

Os resultados que foram reportados nesta Dissertação levaram a interessantes conclusões sobre os sistemas estudados e abriram a possibilidade de novas investigações, capazes de complementar as informações já obtidas e ampliar a aplicabilidade da metodologia empregada. Nesse sentido, a continuidade do trabalho envolve o uso de outros compostos lamelares, de outros fármacos e também pequenas alterações na metodologia.

Do ponto de vista dos compostos lamelares, seria interessante repetir o procedimento aqui adotado de implantação de pastilha em tecidos musculares, desta vez usando HDL de Mg(II), com o propósito de verificar as diferenças que os íons Mg^{2+} e Zn^{2+} podem causar no processo inflamatório e no reparo do tecido, além de também permitir avaliar a possível influência do magnésio no crescimento de diferentes tipos de fibras de colágeno.

Um dos pontos que precisam ser melhor esclarecidos, diz respeito à possível influência que a capacidade sorvedora de íons carbonato apresentada pelo HDL pode ter sobre o processo inflamatório, uma vez que pode ocorrer variação no pH local tanto pela presença da pastilha, que por ser um hidróxido duplo deve alcalinizar em alguma extensão o local, quanto pela remoção de CO_2 . Um experimento simples e que pode ajudar a esclarecer essa questão é aquele que envolve a implantação de uma matriz de HDL com CO_3^{2-} no espaço interlamelar, o que suprimiria a captação de CO_2 do meio tecidual.

Outros compostos lamelares também devem ser avaliados para que se possa ter uma melhor compreensão dos fatores envolvendo a matriz inorgânica que precisam ser levados em consideração quando da escolha dos materiais a serem empregados em aplicações biomédicas.

Isso inclui compostos lamelares que não apresentam a mesma biocompatibilidade dos HDLs aqui estudados, como é o caso de argilas, especificamente montmorilonitas.

Uma das conclusões importantes desta Dissertação é a indicação da ação local do sulindaco, um pró-farmaco que deveria atuar a partir de sua redução no fígado. Uma vez comprovada a ação local do sulindaco com a sua liberação modificada pelo HDL, abre-se a possibilidade de que estudos farmacológicos voltados para a determinação do mecanismo de ação e farmacocinética sejam feitos, com o intuito de esclarecer essa ação. Tais estudos deverão envolver outros fármacos de modo a permitir uma análise comparativa dos processos de liberação local e ação farmacológica.

Finalmente, a metodologia empregada nesta dissertação envolveu a separação das folhas de músculo, o que é uma perturbação branda ao tecido. O fato do tecido muscular não ter sido rompido, assim como vasos sanguíneos não terem sido seccionados, fez com que a resposta inflamatória e o reparo dos tecidos também fossem brandos, ocasionando alterações discretas nos espectros. Um estudo comparativo empregando condição mais agressiva pode permitir a identificação de outras proteínas bioquimicamente importantes tanto para o processo inflamatório quanto para o reparo.

7. Referências

- Adar, F., Evolution and Revolution of Raman Instrumentation-Application of Available Technologies to Spectroscopy and Microscopy, In Handbook of Raman Spectroscopy: From the Research Laboratory to the Process Line, New York CRC Press, 2001, 2, 30.
- Alimova, A., Chakraverty, R., Muthukattil, R., Elder, S., Katz, A., Sriramoju, V., Lipper, S. e Alfano, R. R., In vivo molecular evaluation of guinea pig skin incisions healing after surgical suture and laser tissue welding using Raman spectroscopy, **Journal of Photochemical and Photobiology B**, 96, 3, 2009.
- Antonio, S. G., Aplicação da difração de raios X por policristais e do método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos., 2010, 161 p., Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.
- Araujo, G. L. B., Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona., 2009, 202 p., Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- Bandekar, J., Amide Modes and Protein Conformation, **Biochimica and Biophysics Acta**, 1120, 1992.
- Beldon, P., Basic science of wound healing, **Surgery**, 29, 9, 2010.
- Bergholt, M. S., Zheng, W., Lin, K., Ho, K. Y., Teh, M., Yeoh, K. G., So, J. B. Y. e Huang, Z., Characterizing variability in in vivo Raman spectra of different anatomical locations in the upper gastrointestinal tract toward cancer detection, **Journal of Biomedical Optics**, 16, 3, 2011.
- Bonina, F. P., Giannossi, M. L., Medici, L., Puglia, C., Summa, V. e Tateo, F., Diclofenac-hydrotalcite: In vitro and in vivo release experiments, **Applied Clay Science**, 41, 3-4, 2008.
- Buckley, K. e Matousek, P., Recent advances in the Application of Transmission Raman Spectroscopy to Pharmaceutical Analysis, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 55, 2011.
- Burrueco, M. I., Mora, M., Jiménez-Sanchidrián, C. e Ruiz, J. R., Raman microspectroscopy of hydrotalcite-like compounds modified with sulphate and sulphonate organic anions, **Journal of Molecular Structure**, 1034, 2013.

Carcamo, J. J., Aliaga, A. E., Clavijo, R. E., Branes, M. R. e Campos-Vallette, M. M., Raman study of the shockwave effect on collagens, **Spectrochimica Acta A Molecular Biomolecular Spectroscopy**, 86, 2012.

Carvalho, L. F. C. S., Bonnier, F., O'Callaghan, K., O'Sullivan, J., Flint, S., Byrne, H. J. e Lyng, F. M., Raman micro-spectroscopy for rapid screening of oral squamous cell carcinoma, **Experimental and Molecular Pathology**, 98, 3, 2015.

Cavani, F., Trifirò, F. e Vaccari, A., Hydrotalcite-Type Anionic Clays: Preparation, Properties and Applications, **Catalysis Today**, 11, 1991.

Chakraborti, M., Jackson, J. K., Plackett, D., Gilchrist, S. E. e Burt, H. M., The application of layered double hydroxide clay (LDH)-poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) film composites for the controlled release of antibiotics, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 23, 7, 2012.

Charradi, K., Forano, C., Prevot, V., Madern, D., Ben Haj Amara, A. e Mousty, C., Characterization of hemoglobin immobilized in MgAl-layered double hydroxides by the coprecipitation method, **Langmuir**, 26, 12, 2010.

Chivas, D. D., Humam Body Systems: Structure, Function and Enviroment, 2^a Ed., 2011.

Clark, R. A. F., Wound Repair, **Current Opinion in Cell Biology**, 1, 1989.

Constantino, V. R. L. e Pinnavaia, T. J., Basic Properties od $\text{Mg}^{2+1-x}\text{Al}^{3+x}$ Layered Double Hydroxides Intercalated by Carbonate, Hydroxide, Chloride, and Sulfate Anions, **Inorganic Chemistry**, 34, 1995.

Crane, N. J. e Elster, E. A., Vibrational spectroscopy: a tool being developed for the noninvasive monitoring of wound healing, **Journal of Biomedical and Optics**, 17, 1, 2012.

Cunha, V. R. R., Ferreira, A. M. C., Constantino, V. R., Tronto, J. e Valin, J. B., Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico, **Química Nova**, 33, 1, 2010.

da Silva, M. A. B., Estudo comparativo das anastomoses vasculares com fio de polipropileno e laser de CO2 em suínos avaliadas pela espectroscopia Raman, 2013, Tese de doutorado - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

de Faria, D. L. A., Constantino, V. R. L., Baldwin, K. J., Batchelder, D. N., Pinnavaia, T. J. e Chibwe, M., Raman microspectroscopy of phthalocyanine intercalates: tetrasulphonated cobalt

and nickel phthalocyanines in layered double hydroxide, **Journal of Raman Spectroscopy**, 29, 2, 1998.

De Faria, D. L. A. e de Souza, M. A., Raman Spectra Of Human Skin And Nail Excited In The Visible Region, **Journal of Raman Spectroscopy**, 30, 1999.

De Gelder, J., De Gussem, K., Vandenabeele, P. e Moens, L., Reference database of Raman spectra of biological molecules, **Journal of Raman Spectroscopy**, 38, 9, 2007.

Delarco, M., Fernandez, A., Martin, C. e Rives, V., Release studies of different NSAIDs encapsulated in Mg,Al,Fe-hydrotalcites, **Applied Clay Science**, 42, 3-4, 2009.

Downes, A. e Elfick, A., Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine, **Sensors (Basel)**, 10, 3, 2010.

Evans, C. L. e Xie, X. S., Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine, **Annual Review of Analytical Chemistry**, 2008.

Evans, D. G. e Slade, R. C. T., Structural Aspects of Layered Double Hydroxides, 2005.

Forano, C., Hibino, T., Leroux, F. e Taviot-Guého, C., Layered Double Hydroxides, In Handbook of Clay Science, Elsevier Ltd., 2006, 13.1, 1021-1095.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J., Heyd, J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, N. J., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J. e Fox, D. J., Gaussian 09, Wallingford, CT, USA, 2009.

Frost, R. L., Scholz, R., López, A. e Theiss, F. L., Vibrational spectroscopic study of the natural layered double hydroxide manasseite now defined as hydrotalcite-2H – $\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}[\text{CO}_3]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 118, 0, 2014.

Frushour, B. G. e Koenig, J. L., Raman Scattering of Collagen, Gelatin, and Elastin **Biopolymers**, 14, 1975.

Gailit, J. C. R. A. F., Wound repair in the context of extracellular matrix, **Current Opinion in Cell Biology**, 6, 1994.

Galea, C. A., Nguyen, H. M., George Chandy, K., Smith, B. J. e Norton, R. S., Domain structure and function of matrix metalloprotease 23 (MMP23): role in potassium channel trafficking, **Cell Molecular Life Science**, 71, 7, 2014.

Gautam, R., Vanga, S., Madan, A., Gayathri, N., Nongthomba, U. e Umapathy, S., Raman spectroscopic studies on screening of myopathies, **Analytical Chemistry**, 87, 4, 2015.

Goh, K. H., Lim, T. T. e Dong, Z., Application of layered double hydroxides for removal of oxyanions: a review, **Water Research**, 42, 6-7, 2008.

Gordijo, C. R., Barbosa, C. A., Da Costa Ferreira, A. M., Constantino, V. R. e de Oliveira Silva, D., Immobilization of ibuprofen and copper-ibuprofen drugs on layered double hydroxides, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 94, 5, 2005.

Green, G. A., Understanding NSAIDs: From aspirin to COX-2, **Clinical Cornerstone**, 3, 5, 2001.

Grzesiak, A. L. e Matzger, A. J., New form discovery for the analgesics flurbiprofen and sulindac facilitated by polymer-induced heteronucleation, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 96, 11, 2007.

Henrikson, R. C., Kaye, G. e Mazurkiewicz, J. E., Histology, New York, USA, 1997.

Hollas, J. M., Modern Spectroscopy, 4^a ed., Chichester, England, 2008.

Huard, J., Li, Y. e Fu, F. H., Muscle Injuries and Repair: Current Trends in Research, **The Journal of Bone & Joint Surgery**, 84, 5, 2002.

Jain, R., Calderon, D., Kierski, P. R., Schurr, M. J., Czuprynski, C. J., Murphy, C. J., McAnulty, J. F. e Abbott, N. L., Raman spectroscopy enables noninvasive biochemical characterization and identification of the stage of healing of a wound, **Analytical Chemistry**, 86, 8, 2014.

Junqueira, L. C. U. e Carneiro, J., Histologia Básica, 11^a Ed., Rio de Janeiro, 2008.

Khan, A. I., Lei, L., Norquist, A. J. e O'Hare, D., Intercalation and controlled release of pharmaceutically active compounds from a layered double hydroxide, **Chemical Communications**, 22, 2001.

Kloprogge, J. T., Hickey, L. e Frost, R. L., The effect of varying synthesis conditions on zinc chromium hydrotalcite: a spectroscopic study, **Materials Chemistry and Physics**, 89, 1, 2005.

Kloprogge, J. T., Hickey, L. e Frost, R. L., FT-Raman and FT-IR spectroscopic study of synthetic Mg/Zn/Al-hydrotalcites, **Journal of Raman Spectroscopy**, 35, 11, 2004.

Kong, X., Jin, L., Wei, M. e Duan, X., Antioxidant drugs intercalated into layered double hydroxide: Structure and in vitro release, **Applied Clay Science**, 49, 3, 2010.

Koo, C. H., Kim, S. H. e Shin, W., Crystal Structure of Antiinflammatory Sulindac, **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 6, 4, 1985.

Krafft, C. e Popp, J., The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 407, 3, 2015.

Lanza, R., Langer, R. e Vacanti, J. P., Principles of Tissue Engineering Wound repair, 4^a Ed., Boston, 2014.

Larsson, K. e Hellgren, L., Study of the Combined Raman and Fluorescence Scattering from Human Blood Plasma, **Experientia**, 30, 1974.

Lemke, T. L. e Williams, D. A., Foyes Principles of Medicinal Chemistry, 7^a ed., Philadelphia, 2013.

Li, F. e Duan, X., Applications of Layered Double Hydroxides, 119, 2006.

Llinàs, A., Box, K. J., Burley, J. C., Glen, R. C. e Goodman, J. M., A new method for the reproducible generation of polymorphs: two forms of sulindac with very different solubilities, **Journal of Applied Crystallography**, 40, 2, 2007.

Lombardo, G. M., Pappalardo, G. C., Costantino, F., Costantino, U. e Sisani, M., Thermal Effects on Mixed Metal (Zn/Al) Layered Double Hydroxides: Direct Modeling of the X-Ray Powder Diffraction Line Shape Through Molecular Dynamics Simulations, **Chemistry of Materials**, 20, 17, 2008.

Makowski, A. J., Davidson, J. M., Mahadevan-Jansen, A. e Jansen, E. D., In vivo analysis of laser preconditioning in incisional wound healing of wild-type and HSP70 knockout mice with Raman spectroscopy, **Lasers Surgery Medicine**, 44, 3, 2012.

Manoharan, R., Wang, Y. e Feld, M. S., Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy, **Spectrochimica Acta A Part A**, 52, 1996.

Matousek, P., Draper, E. R. C., Goodship, A. E., Clark, I. P., Ronayne, K. L. e Parker, A. W., Noninvasive Raman Spectroscopy of Human Tissue *In Vivo*, **Applied Spectroscopy**, 60, 7, 2006.

Maxson, S., Lopez, E. A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkova, A. e Leroux, M. A., Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair, **Stem Cells Translational Medicine**, 1, 2012.

McVey, A. e Crain, J., Nonlinear Optical Methods for Cellular Imaging and Localization, **Methods**, 68, 2014.

Medzhitov, R., Origin and physiological roles of inflammation, **Nature**, 454, 7203, 2008.

Michalany, J., Técnica histológica em anatomia patológica, 2ª ed., São Paulo, 1990.

Minagawa, K., Berber, M. R., Hafez, I. H., Mori, T. e Tanaka, M., Target delivery and controlled release of the chemopreventive drug sulindac by using an advanced layered double hydroxide nanomatrix formulation system, **Journal of Material Science and Material Medicine**, 23, 4, 2012.

Mora, M., Jiménez-Sanchidrián, C. e Rafael Ruiz, J., Raman spectroscopy study of layered-double hydroxides containing magnesium and trivalent metals, **Materials Letters**, 120, 2014.

Morris, M. D., Determination of Catecholamines by Resonance Raman Spectroscopy of Their Aminochromes, **Analytical Letters**, 9, 5, 1976.

Morris, M. D., Resonance Raman spectra of the aminochromes of some biochemically important catechol amines, **Analytical Chemistry**, 47, 14, 1975.

Moslen, M. T. e Smith, C. V., Free radical mechanisms of tissue injury, Estados Unidos da América, 1992.

Movasaghi, Z., Rehman, S. e Rehman, I. U., Raman Spectroscopy of Biological Tissues, **Applied Spectroscopy Reviews**, 42, 5, 2007.

Nakamoto, K., *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 1^a ed., New York, 1963.

Nguyen, T. T., Happillon, T., Feru, J., Brassart-Passco, S., Angiboust, J.-F., Manfait, M. e Piot, O., Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration, **Journal of Raman Spectroscopy**, 44, 9, 2013.

Ozaki, Y. e Iriyama, K., Potential of Raman Spectroscopy in Medical Science, In *Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects*, Amsterdam, Elsevier, 1987,

Ozaki, Y., Mizuno, A., Itoh, K., Matsushima, S. e Iriyama, K., Raman Spectroscopic Study Of Cataract Formation: Emory Mouse Cataract, **Applied Spectroscopy** 41, 4, 1987.

Paikaray, S. e Hendry, M. J., The role of trivalent cations and interlayer anions on the formation of layered double hydroxides in an oxic-CO₂ medium, **Applied Surface Science**, 263, 2012.

Palmer, S. J., Frost, R. L., Ayoko, G. e Nguyen, T., Synthesis and Raman spectroscopic characterisation of hydrotalcite with CO₃²⁻ and (MoO₄)²⁻ anions in the interlayer, **Journal of Raman Spectroscopy**, 39, 3, 2008.

Palmer, S. J., Frost, R. L. e Spratt, H. J., Synthesis and Raman spectroscopic study of Mg/Al,Fe hydrotalcites with variable cationic ratios, **Journal of Raman Spectroscopy**, 40, 9, 2009.

Parello, M. L., Rojas, R. e Giacomelli, C. E., Dissolution kinetics and mechanism of Mg-Al layered double hydroxides: a simple approach to describe drug release in acid media, **Journal of Colloid Interface Science**, 351, 1, 2010.

Pelton, J. T. e McLean, L. R., Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure, **Analytical Biochemistry**, 277, 2, 2000.

Pézolet, M. e Georgescauld, D., Raman spectroscopy of nerve fibers. A study of membrane lipids under steady state condition, **Biophysical Journal**, 47, 3, 1985.

Pézolet, M., Pigeon-Gosselin, M. e Nadeau, J., Laser Raman scattering. A molecular probe of the contractile state of intact single muscle fibers, **Biophysical Journal**, 31, 1, 1980.

Plakogiannis, F. M. e McCauley, J. A., Sulindac, In *Analytical Profiles of Drug Substances*, Orlando, Florida, Academic Press, INC., 1984, 17, 573-596.

Prasad, B. E., Dinamani, M., Vishnu Kamath, P. e Mehta, S. H., Hexacyanoferrate (III) as an electroactive probe for the investigation of the interlayer basicity of the layered double hydroxide (LDH) of Mg with Al, **Journal of Colloid Interface Science**, 348, 1, 2010.

Rae, A., Stosch, R., Klapetek, P., Walker, A. R. H. e Roy, D., State of the Art Raman Techniques for Biological Applications, **Methods**, 68, 2014.

Rahaman, M. S. e Morris, M. D., Determination of adrenaline and noradrenaline by resonance Raman spectrometry., **Talanta**, 1, 1976.

Ricard-Blum, S., The collagen family, **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, 3, 1, 2011.

Rives, V., Del Arco, M. e Martin, C., Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): a review, **Journal of Controlled Release**, 169, 1-2, 2013.

Rocha, A. M., Materiais Híbridos Nanoestruturados à Base de Hidróxidos Duplos Lamelares e o Fármaco Sulindaco, 2015, tese de doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, a ser defendida.

Rodrigues, L. A., Figueiras, A., Veiga, F., de Freitas, R. M., Nunes, L. C., da Silva Filho, E. C. e da Silva Leite, C. M., The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: a review, **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, 103, 2013.

Rodrigues, L. A. d. S., Figueiras, A., Veiga, F., de Freitas, R. M., Nunes, L. C. C., da Silva Filho, E. C. e da Silva Leite, C. M., The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: A review, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 103, 2013.

Rousseau, M., Lefèvre, T., Beaulieu, L., Asakura, T. e Pézolet, M., Study of Protein Conformation and Orientation in Silkworm and Spider Silk Fibres Using Raman Microspectroscopy, **Biomacromolecules**, 5, 2004.

Roy, S., Chamberlin, B. e Matzger, A. J., Polymorph Discrimination Using Low Wavenumber Raman Spectroscopy, **Organic Process Research & Development**, 17, 7, 2013.

Sala, O., Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho., 2ª ed., São Paulo, 2008.

Sánchez-González, E. G., Yépez-Mulia, L., Jesús Hernández-Abad, V. e Jung Cook, H., The influence of polymorphism on the manufacturability and in vitro dissolution of sulindac-containing hard gelatin capsules, **Pharmaceutical Development and Technology**, 20, 3, 2015.

Sato, S., Higuchi, S. e Tanaka, S., Determination of small amounts of some sulfonamide drugs by resonance raman spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, 120, 1980.

Shannon, R. D., Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides, **Acta Crystallographica A**, 32, 1976.

Synytsya, A., Judexova, M., Hoskovec, D., Miskovicova, M. e Petruzalka, L., Raman spectroscopy at different excitation wavelengths (1064, 785 and 532 nm) as a tool for diagnosis of colon cancer, **Journal of Raman Spectroscopy**, 45, 10, 2014.

Talari, A. C. S., Evans, C. A., Holen, I., Coleman, R. E. e Rehman, I. U., Raman spectroscopic analysis differentiates between breast cancer cell lines, **Journal of Raman Spectroscopy**, 46, 5, 2015.

Talari, A. C. S., Movasaghi, Z., Rehman, S. e Rehman, I. u., Raman Spectroscopy of Biological Tissues, **Applied Spectroscopy Reviews**, 50, 1, 2014.

Tidball, J. G., Mechanism of muscle injury, repair and regeneration., **Comprehensive Physiology**, 1, 2011.

Tolosa, E. M. C., Rodrigues, C. J., Behmer, O. A. e Neto, A. G. F., Manual de técnicas para histologia normal e patológica, 2ª ed., Barueri, 2003.

Tros De Ilarduya, M. C., Martín, C., GoñI, M. M. e Martínez-Ohárriz, M. C., Polymorphism of sulindac: Isolation and characterization of a new polymorph and three new solvates, **Journal of Pharmacological Science**, 86, 2, 1997.

Tu, A. T., Raman Spectroscopy in Biology, New York, 1982.

Tu, H. e Boppart, S. A., Coherent Anti-Stokes Raman Scattering microscopy: Overcoming Technical barriers for Clinical Translation, **Journal of Biophotonics**, 1, 2, 2014.

Tuma, R., Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies, **Journal of Raman Spectroscopy**, 36, 4, 2005.

Valdés, R., Stefanov, S., Chiussi, S., López-Alvarez, M. e González, P., Pilot research on the evaluation and detection of head and neck squamous cell carcinoma by Raman spectroscopy, **Journal of Raman Spectroscopy**, 45, 7, 2014.

Vane, J. R. e M., B. R., Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, **The American Journal of Medicine**, 104, 3, 1998.

Vial, S., Prevot, V., Leroux, F. e Forano, C., Immobilization of urease in ZnAl Layered Double Hydroxides by soft chemistry routes, **Microporous and Mesoporous Materials**, 107, 1-2, 2008.

Vieira, A. C., Moreira, R. L. e Dias, A., Raman Scattering and Fourier Transform Infrared Spectroscopy of $\text{Me}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Me = Mg, Ni, Zn, Co, and Mn) and $\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Hydrotalcites, **Journal of Physical Chemistry C**, 113, 30, 2009.

Viseras, C., Cerezo, P., Sanchez, R., Salcedo, I. e Aguzzi, C., Current challenges in clay minerals for drug delivery, **Applied Clay Science**, 48, 3, 2010.

Wang, L., Chiou, S. Y., Shen, Y. T., Yen, F. T., Ding, H. Y. e Wu, M. J., Anti-inflammatory effect and mechanism of the green fruit extract of *Solanum integrifolium* Poir, **Biomed Res Int**, 2014, 2014.

Yu, N.-T., Raman Spectroscopy: A Conformational Probe in Biochemistry, **CRC Critical Reviews in Biochemistry**, 4, 3, 1977.

Zhang, D., Wang, P., Slipchenko, M. N. e Cheng, J. X., Fast vibrational imaging of single cells and tissues by stimulated Raman scattering microscopy, **Accounts of Chemical Research**, 47, 8, 2014.

Zhao, X., Zhang, F., Xu, S., Evans, D. G. e Duan, X., From Layered Double Hydroxides to ZnO-based Mixed Metal Oxides by Thermal Decomposition: Transformation Mechanism and UV-Blocking Properties of the Product, **Chemistry of Materials**, 22, 13, 2010.

Zoladek, A. B., Johal, R. K., Garcia-Nieto, S., Pascut, F., Shakesheff, K. M., Ghaemmaghami, A. M. e Notingher, I., Label-free molecular imaging of immunological synapses between dendritic and T cells by Raman micro-spectroscopy, **Analyst**, 135, 12, 2010.

SÚMULA CURRICULAR

1. Dados Pessoais

Nome: Otávio Mendes Gil

Filiação: Hector Alexandre Chaves Gil e Égle Ferraz Mendes

Nascimento: 03/01/1991 – São Paulo/SP – Brasil

2. Formação

Ensino Fundamental e médio

Escola Cooperativa de Cotia – Cotia/SP (2001-2005)

Colégio Objetivo Granja Viana – Cotia/SP (2006-2008)

Graduação

Bacharel em química – Universidade de São Paulo-SP-Brasil (2009-2013)

Pós-graduação

Mestrado em química – Universidade de São Paulo –SP-Brasil (2013-2015)

Título: Espectroscopia Raman aplicada a resposta bioquímica de tecidos a compostos lamelares.

Sob orientação da Prof.^a Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria

3. Estágios

1. Iniciação Científica no Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) do Instituto de Química da USP sob orientação da Prof.^a Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria, realizada de 2011 a 2013, com bolsa concedida pelo CNPq durante todo o período.

Título: **Anatase em documentos histórico-culturais: investigação da formação de TiO₂ a partir de processamento de minerais.**

2. Bolsa de mérito acadêmico concedida pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo e realizada de janeiro a março de 2012 na University of Leicester para

desenvolvimento do projeto “**Biological markers in minerals exposed to extreme environments by Raman spectroscopy with portable equipment**” sob orientação do Prof. Dr. Howell G. M. Edwards, Professor Honorário da University of Leicester e Professor Emérito da University of Bradford, ambas na Inglaterra.

3. Monitor da disciplina QFL 2452 – Físico-Química II, realizada no Instituto de Química/USP sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Susana Ines Cordoba de Torresi. Primeiro semestre de 2012.
4. Monitor da disciplina QFL 2143 – Química dos Elementos, realizada no Instituto de Química/USP sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Vera Regina Leopoldo Constantino. Segundo semestre de 2013.
5. Monitor da disciplina QFL 2144 – Fundamentos de Espectroscopia e Métodos Espectroscópicos, realizada no Instituto de Química/USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Koiti Araki. Primeiro semestre de 2014 pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).
6. Monitor da disciplina QFL 2441 – Físico-Química I, realizada no Instituto de Química /USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rômulo Augusto Ando. Segundo semestre de 2014 pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

4. Produção acadêmica

- 1- Gil, O. M., Faria, D. L. A., **Detection of anatase in cultural heritage**. Workshop on Applied Raman Spectroscopy, 2012. Apresentação oral.
- 2- Gil, O. M., Rocha, M. A., Constantino, V. R. L., Koh, I. H. J., Faria, D. L. A., **Avaliação e acompanhamento do processo inflamatório em músculos de ratos por espectroscopia Raman**, 38^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015. Apresentação de pôster.

- 3- Gil, O. M.; Aguayo, T., Faria, D. L. A., **Comparação entre espectrometros Raman de bancada e transportáveis: Perspectivas forenses**, 4º Encontro Nacional de Química Forense, 2014. Apresentação de pôster.
- 4- Gil, O. M., D. L. A., **Anatase em carregadores de Pigmentos e suas implicações em documentos históricos**, 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013. Apresentação de pôster.
- 5- Gil, O. M., Sala, O., D. L. A., **Medidas de fator de depolarização para atribuição de anatase como sólido policristalino**, 3º Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2013. Apresentação de pôster.
- 6- Gil, O. M., D. L. A., **Efeitos de matriz na estabilização de anatase e implicações histórico-culturais**, 2º Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, 2011. Apresentação de pôster
- 7- Gil, O. M., D. L. A., **Considerações químicas sobre a autenticidade de documentos medievais**, 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011. Apresentação de pôster.
- 8- Gil, O. M., D. L. A., **Anatase em documentos histórico-culturais: Investigação da transformação de TiO_2 por processamentos minerais**, 28ª Semana da Química - "Ano Internacional da Química: celebrando as conquistas da Química para a Humanidade", 2011. Apresentação de pôster.